



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

Programa de Doctorado en ciencias Biomédicas

Instituto de Ciencias Físicas / Centro de Ciencias Genómicas

# **Evolución y herencia de la resistencia adaptativa a múltiples antibióticos en bacterias: un enfoque de la biología de sistemas.**

TESIS DE DOCTORADO QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

SANTIAGO SANDOVAL MOTTA

Dr. Maximino Aldana González

Dr. Hernán Larralde Ridaura

Dr. Julio Collado Vides

México D.F. 2015



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.

# Índice

1. El ascenso y la caída de los antibióticos; un problema de salud mundial
  - 1.1. La Belle Époque
  - 1.2. Viva la Resistance
  - 1.3. Crimen y Castigo
2. Los mecanismos de Resistencia a los Antibióticos; específicos y no específicos
  - 2.1. Mecanismos Específicos
    - 2.1.1. Mutaciones
    - 2.1.2. Transferencia Horizontal
  - 2.2. Mecanismos inespecíficos y la resistencia a múltiples fármacos
    - 2.2.1. Bombas de Eflujo
    - 2.2.2. El sistema AcrAB-TolC como mecanismo de resistencia
3. El locus *mar* y la resistencia adaptativa
  - 3.1. El descubrimiento
  - 3.2. Herencia epigenética y reversibilidad
  - 3.3. Crecimiento desacelerado
  - 3.4. Asimilación Genética
  - 3.5. El sistema Mar como mediador del fenotipo resistente
4. Modelo unicelular de la resistencia adaptativa
  - 4.1. Planteamiento
  - 4.2. Validación experimental
  - 4.3. División celular: Bombas V.S. Nutrientes
5. Modelo Poblacional
  - 5.1. Variabilidad, Herencia y Crecimiento
  - 5.2. Cuatro posibles escenarios
  - 5.3. Resistencia Adaptativa
  - 5.4. Reversibilidad
  - 5.5. Asimilación genética
  - 5.6. Otros experimentos
  - 5.7. Predicciones y conclusiones finales
6. Discusión y Conclusiones
  - 6.1. Memoria y mecanismos de transmisión de información
7. Referencias

# Resumen

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud a nivel internacional. La situación actual es tal, que muchas de las infecciones en pacientes humanos presentan resistencia al menos a un antibiótico de uso común. De hecho, cada vez resulta más frecuente encontrar infecciones resistentes no sólo a uno, sino a un amplio espectro de antibióticos, haciendo que el tratamiento de estas infecciones sea más complicado y más costoso. La *Resistencia Adaptativa* (RA) forma parte de este tipo de resistencias múltiples pero tiene la característica de que puede ser desarrollada en muy poco tiempo mediante el sometimiento de la población de bacterias a incrementos graduales en la concentración de antibiótico. De esta forma, las bacterias pueden ser “entrenadas” para resistir concentraciones cercanas a los límites de dilución de varias clases de antibióticos. Sin embargo, sucede que si la población resistente de pronto es cambiada a un medio libre de agentes antimicrobianos, sus niveles de resistencia se pierden y su susceptibilidad inicial es recuperada en unas cuantas generaciones.

Estudios recientes en torno al origen de la resistencia adaptativa han propuesto que la heterogeneidad poblacional en la expresión genética (en particular aquella relacionada con la producción de bombas de eflujo), así como una correlación fenotípica entre las bacterias, son procesos fundamentales para su surgimiento. No obstante, hasta la fecha se desconocen los mecanismos específicos por los cuales la variabilidad y las correlaciones emergen, así como la importancia que tiene cada uno de ellos en el surgimiento de la RA. De igual forma, la razón detrás de la baja estabilidad del fenotipo resistente es hasta el momento desconocida.

En este trabajo se presenta un modelo matemático-computacional que propone mecanismos específicos capaces de dar origen a la resistencia adaptativa, al mismo tiempo que explica la razón de su baja estabilidad en ausencia de antibiótico. Nuestros resultados provienen de simulaciones a nivel poblacional de la dinámica de una red de regulación de bombas de eflujo en presencia y ausencia de antibiótico, tomando en cuenta factores como tasas de crecimiento, muerte, división, y cambios genéticos y epigenéticos. Con base en nuestras simulaciones, proponemos que los tres procesos más importantes para el fenotipo de la resistencia adaptativa son: 1) la presencia de heterogeneidad en la expresión de los factores de transcripción encargados de modular la expresión de bombas de eflujo 2) un mecanismo de herencia que correlacione los patrones de expresión de la red de regulación a través de divisiones celulares y 3) un costo energético asociado a la producción y funcionamiento de las bombas de eflujo.

Cabe mencionar que los resultados de nuestro modelo se contraponen a la idea convencional de que altas tasas de mutación son las responsables del origen de la RA. A su vez, proponemos un mecanismo de herencia epigenética (vía metilación del DNA), como el principal causante del aumento de resistencia, volviéndolo un posible blanco para el desarrollo de tratamientos contra la resistencia a antibióticos.

# 1

## El ascenso y la caída de los antibióticos; un problema de salud mundial.

### 1.1. *La Belle Époque.*

La época de oro de los antibióticos comenzó con un descubrimiento casi accidental. Tras dejar una serie de cultivos bacterianos en contacto con la intemperie y ausentarse de su laboratorio por un periodo vacacional, el microbiólogo Alexander Fleming encontró a su regreso que un gran número de platos de cultivo habían sido contaminados por hongos. Inesperadamente, aquellos platos que contenían el hongo *Penicillium* presentaban un extraño fenómeno, pues el crecimiento bacteriano alrededor del hongo se había detenido por completo <sup>[1]</sup>. A pesar de que este descubrimiento revolucionaría la medicina para siempre, por 10 años nadie le prestó atención. Fue hasta el año de 1939 cuando H. Florey y E. Chain lograron aislar de dicho hongo un compuesto ahora conocido como *penicilina* y lo usaron para tratar con éxito infecciones bacterianas <sup>[2]</sup>. Desde entonces la penicilina ha sido el caballo de batalla de la humanidad contra las infecciones bacterianas y se estima que gracias a su uso, millones de vidas humanas han sido salvadas.

El gran éxito de la penicilina se debió principalmente a que su aislamiento y producción en masa, fueron de la mano con el auge de la segunda guerra mundial, en la cual enfermedades tales como la neumonía, la escarlatina, la septicemia y las infecciones cutáneas causadas por heridas abiertas estaban a la orden del día <sup>[3]</sup>. Pese a que anteriormente otros compuestos antimicrobianos como la arsfenamina (1907) y el prontosil (1930) habían sido descubiertos <sup>[4, 5, 6]</sup>, la penicilina fue la que marcó el inicio de la época

de oro de los antibióticos <sup>[4,6]</sup>. En aquellos años, a pesar de la gran efectividad de la penicilina, la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos continuó activamente y para el año de 1950 el arsenal antibacteriano de la humanidad contaba ya con tres antibióticos más: la estreptomina, el cloranfenicol y la tetraciclina <sup>[4,7]</sup>.

En esta época, parecía que no había infección que no pudiera ser combatida por los antibióticos; los parásitos intracelulares, la tuberculosis y bacterias de muchos tipos eran efectivamente erradicadas por estos compuestos <sup>[3,4]</sup>. Además, en las décadas posteriores, surgieron también los antibióticos sintéticos como las sulfonamidas, el ácido aminosalicílico y las isoniazidas <sup>[4,7,8]</sup>. Todos usados eficientemente para combatir todo tipo de infecciones, principalmente las entonces letales tuberculosis y neumonía. Sin embargo, como se verá más adelante, la situación ha cambiado mucho desde entonces, en gran parte por el uso excesivo de estos compuestos.

Un antibiótico es definido como toda aquella sustancia que elimina o inhibe el crecimiento de un microorganismo <sup>[9]</sup>. En la actualidad, existen alrededor de 200 antibióticos aprobados por la FDA (U.S.A.) <sup>[8]</sup>, los cuales representan nuestra primera y más importante línea de defensa contra los más de 1,400 patógenos (causantes de infecciones) humanos, conocidos hasta el momento <sup>[10,11]</sup>. Pero además de que el desequilibrio del número de antibióticos contra número de patógenos suena de por sí desalentador, estas batallas no se pelean de uno contra uno. El mal uso de los antibióticos aunado a la capacidad de las bacterias de adaptarse a su medio, nos ha dejado en un escenario en donde muy pocos antibióticos cumplen su función adecuadamente <sup>[11,12]</sup>. Un ejemplo claro de éste fenómeno se dio con la penicilina y la ampicilina. En 1960, a pesar de ya haberse encontrado bacterias resistentes a la penicilina, estos dos compuestos eran capaces de acabar con la mayoría de los casos de gonorrea. Sin embargo el día de hoy, el 30% de los casos de esta enfermedad presentan un alto índice de resistencia a estos y otros antibióticos <sup>[11]</sup>. Además de esto, las bacterias se vuelven resistentes en periodos cada vez más cortos en comparación con el tiempo que usualmente lleva a desarrollar e introducir un nuevo antibiótico al mercado <sup>[12]</sup>.

## 1.2. *Viva la Resistance.*

La resistencia a antibióticos en la naturaleza, es tan vieja como su producción. Esto resulta obvio al notar que la gran mayoría de los organismos que producen antibióticos no son afectados por los mismos <sup>[13]</sup>. Pero fuera de esta resistencia trivial, existe todo un recuento de casos en los que al poco tiempo de ser descubierto un antibiótico se encuentran organismos resistentes a éste <sup>[10, 11, 12, 13]</sup>. Por ejemplo sabemos que para el año de 1959, tan sólo nueve años después del aislamiento de la tetraciclina, ya se habían encontrado bacterias resistentes a ella. Y para el inicio de los años 70's, bacterias resistentes a eritromicina y meticilina habían sido también reportadas <sup>[11]</sup>. Este tipo de eventos (antibiótico » resistencia) se han repetido una y otra vez a lo largo de la historia, dejándonos en una situación en la que casi toda bacteria patógena existente resulta resistente a al menos un antibiótico de uso común <sup>[12,13]</sup>.

Entre las causas más importantes de la generación de bacterias resistentes, está el uso desmedido de antibióticos <sup>[11]</sup>. Una de las primeras alertas sobre el abuso de estas sustancias se dio en el año de 1998 cuando se observó que el número de prescripciones médicas anuales de antibióticos llegaba a los 80 millones <sup>[11]</sup> y que aproximadamente el 50% de éstas eran otorgadas innecesariamente <sup>[11]</sup>. Si agregamos el hecho de que en muchos países ni siquiera se requería una receta médica para obtenerlos (México por ejemplo) <sup>[11]</sup> significaría que de una producción de aproximadamente trece toneladas de antibióticos al año, una enorme cantidad de ellos resultaban completamente innecesarios. Por otro lado, sabemos que la agricultura y el ganado abarcan casi el 60% de la producción y consumo anual de antibióticos, añadiendo 18 toneladas anuales más a la cifra total <sup>[11,14]</sup>. Estas cantidades reflejan claramente el hecho de que, desde hace relativamente poco tiempo, muchos microorganismos están en contacto con agentes antimicrobianos en mayor medida que nunca antes en su historia.

Por el momento, en México no es posible conseguir un registro del número de infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos. Sin embargo en países como los Estados Unidos de América (EUA), en donde dicho registro es de acceso público, se ha calculado que aproximadamente *dos millones de personas* son infectadas por bacterias resistentes a al menos un antibiótico designado para su tratamiento <sup>[11]</sup>. Y algunas de estas bacterias, además, resultan resistentes a todos los antibióticos aprobados a la fecha,

provocando que los médicos deban recurrir a compuestos todavía en fase de prueba, los cuales muchas veces conllevan efectos secundarios severos <sup>[11,13]</sup>.

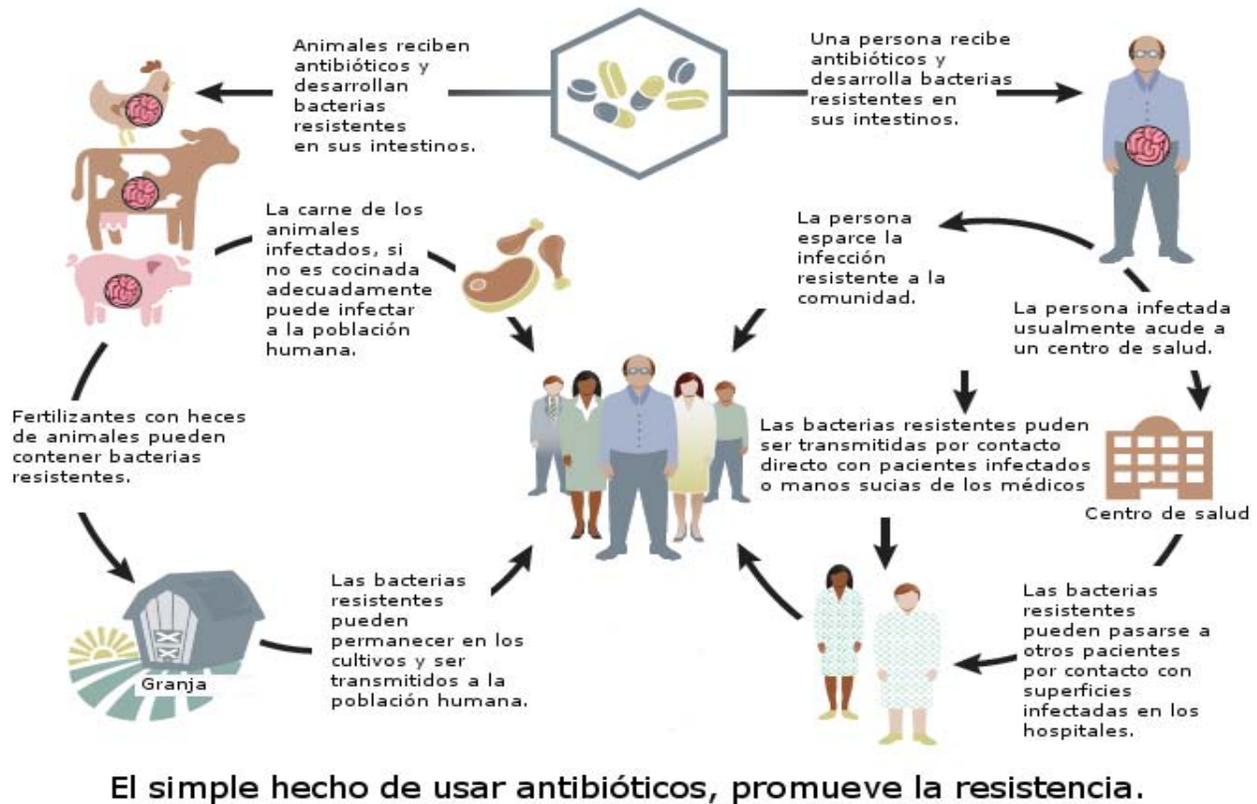
En EUA el número total de muertes directamente atribuibles a infecciones resistentes es de aproximadamente **23,000 personas al año** <sup>[11]</sup>. No obstante, un número mucho mayor de fallecimientos es atribuible a dichas infecciones debido a que esta cifra sólo toma en cuenta las muertes que son consecuencia directa de la infección bacteriana, sin contar todos aquellos fallecimientos provocados por las condiciones derivadas de la propia infección <sup>[11]</sup>.

En cuanto a las principales fuentes de microorganismos resistentes a antibióticos (Figura 1.1), estudios recientes muestran que en orden de importancia los principales reactores biológicos que promueven la resistencia microbiana son <sup>[11, 15]</sup>:

- La **microbiota intestinal humana**, compuesta por más de 500 especies a las cuales se les somete con relativa frecuencia a presiones selectivas de resistencia mediante su contacto con antibióticos.
- Los **hospitales**, las **granjas** y cualquier otro lugar en donde animales susceptibles (humanos incluidos) se encuentren hacinados y por lo mismo expuestos a intercambios bacterianos.
- Las **aguas residuales** así como cualquier tipo de **desechos biológicos** (muchos originados por los reactores #2) conforman el tercer reactor más importante debido a la alta interacción que tienen los microorganismos y a las distintas presiones selectivas ambientales a las que se enfrentan.
- El **suelo** resulta también un perfecto reactor para la formación de cepas resistentes debido a la posibilidad de mezcla de los organismos generados en los reactores anteriores con muchos microorganismos silvestres.

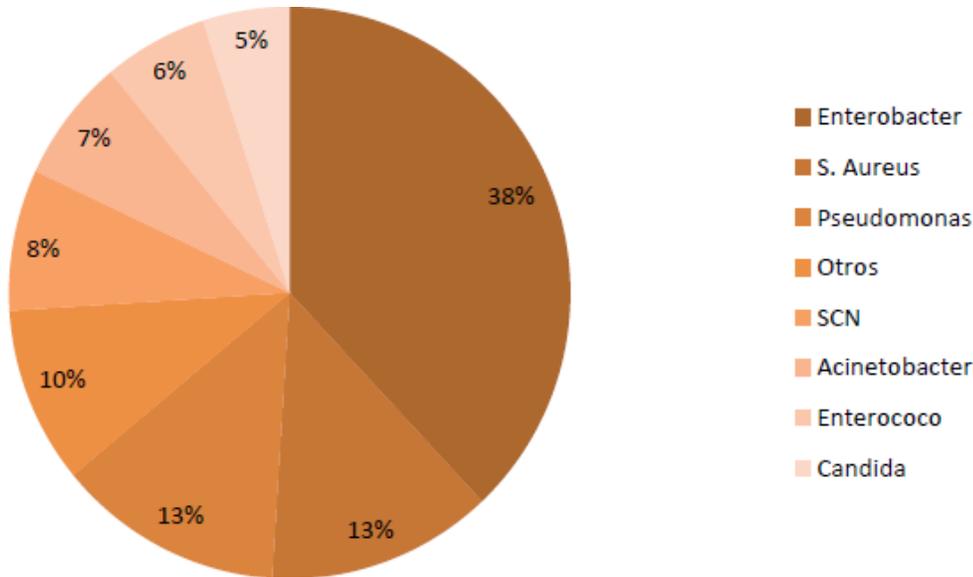
Es importante resaltar que a pesar de que un gran número de infecciones son contraídas en la comunidad general, muchas ocurren en hospitales y otras instalaciones médicas <sup>[11,16]</sup>. Dicho contagio, entre otros factores, puede deberse al contacto con superficies infectadas, las malas condiciones de higiene del personal o de los instrumentos médicos, o bien por microorganismos suspendidos en el aire y transportados por sistemas de ventilación. Otro factor importante es el hecho de que la mayoría de las personas que acuden a estos centros de atención se encuentran inmunocomprometidas o bien con heridas expuestas, haciendo

que la propagación de la infección se vuelva más alta. Estas infecciones adquiridas en centros de salud con conocidas como **infecciones nosocomiales**, y son mucho más frecuentes y letales de lo que podríamos imaginar [11,16].



**Figura 1.1 Mecanismos principales de resistencia a los antibióticos debido al mal uso y a la negligencia [11].**

En nuestro país se estima que entre el 2% y el 15.8% de los pacientes en centros de salud son afectados por una infección nosocomial [16]. Esta cifra aumenta a un 23.2% para las unidades de cuidados intensivos, en donde contraer una infección puede tener graves consecuencias. De las infecciones nosocomiales más frecuentes están: la neumonía (39.7%), seguida de la infección urinaria (20.5%), la de herida quirúrgica (13.3%) y por último la del torrente sanguíneo (7.3%). La letalidad asociada a éstas es del 25.5% de los casos, siendo las **enterobacterias** los principales agentes infecciosos (Figura 1.2) [16]. Es importante mencionar que esta familia de bacterias, debido a mecanismos que discutiremos más adelante, presenta uno de los mayores índices de resistencia a antibióticos [11, 16].



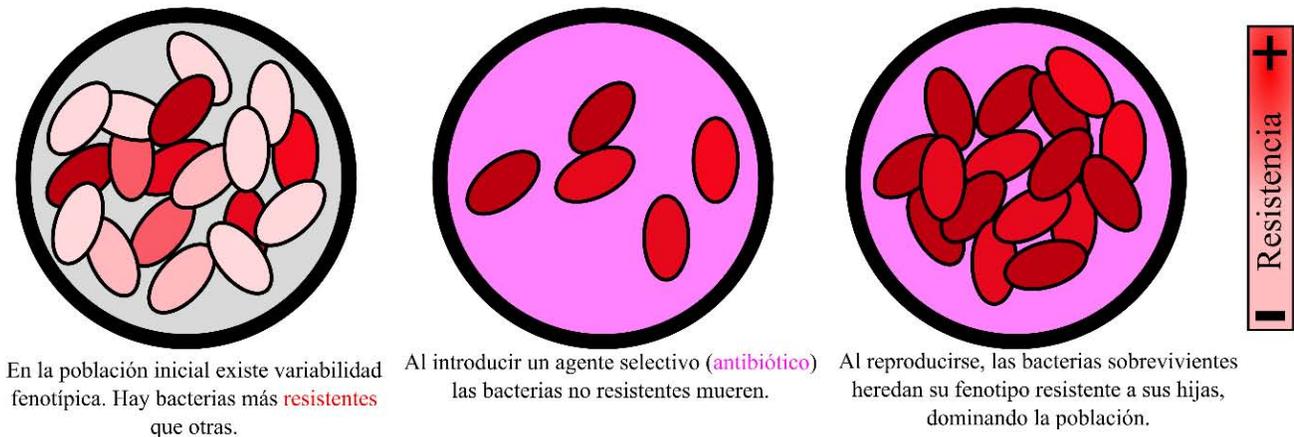
**Figura 1.2.**  
Microorganismos  
causantes de  
infecciones  
nosocomiales [16].

**Microorganismos identificados en las infecciones nosocomiales en los hospitales  
generales de México**

### ***1.3. Crimen y castigo***

Un ejemplo del mal uso de los antibióticos sucede con la gripa y otras enfermedades respiratorias. Ha sido reportado que el 90% de las infecciones respiratorias en humano son causadas por agentes virales [17], los cuales no son erradicados con el uso de antibióticos. Por lo mismo, entre los usos erróneos más frecuentes de los antibióticos está el intentar usarlos para curar este tipo de males [11, 18]. Pues a pesar de que la gran mayoría de los antibióticos son inocuos para nuestras células, el tomarlos sin necesidad puede causar interferencia con otros medicamentos que el paciente realmente requiera, pudiendo causar efectos secundarios adversos [11]. Además, los antibióticos afectan negativamente el balance de nuestra microbiota (conjunto de microorganismos que vive en nuestro cuerpo) debido a que sus mecanismos de acción no hacen ningún tipo de discriminación entre los microorganismos patógenos y los benéficos [11]. Otra de las consecuencias de tomar antibióticos innecesariamente es el desarrollo de la resistencia [11, 18]. En cuanto más usemos antibióticos, más microorganismos resistentes a ellos vamos a encontrar [11]. Vale la pena aclarar que un paciente no es quien se vuelve resistente a los antibióticos, sino que son los microorganismos los que adquieren la resistencia, provocando que el paciente permanezca enfermo pese al tratamiento.

En general podemos decir que el uso de antibióticos promueve la resistencia cuando: **i)** estos se usan de forma innecesaria, **ii)** cuando el suministro del antibiótico se detiene antes de tiempo o bien **iii)** si la dosis del mismo no se sigue adecuadamente en cuanto a tiempo y/o concentración <sup>[11]</sup>. Cualquiera de estos escenarios suscita la selección de microorganismos resistentes, haciendo que en poco tiempo, éstas predominen en la población, generando una infección (Figura 1.3) <sup>[11]</sup>.



**Figura 1.2. Desarrollo de la Resistencia por el uso de antibióticos. Reelaborado <sup>[11]</sup>.**

Otro importante problema asociado a la resistencia a antibióticos es la falta de programas de desarrollo de éstos en la industria farmacéutica <sup>[11, 12]</sup> (Figura 1.4). Actualmente sólo 5 compañías cuentan con programas extensos de desarrollo de antibióticos: GlaxoSmithKline, Novartis, AstraZeneca, Merck y Pfizer <sup>[12]</sup>. Las razones de dicha escasez son varias. Por un lado, pese a que las ventas de antibióticos se acercan a los 25 billones de dólares anuales (E.U.A), la venta de antidepresivos y antihipertensivos es mucho más redituable ya que éstos últimos deben ser consumidos diariamente y no sólo en los periodos de infección (como en el caso de los antibióticos) <sup>[12]</sup>.

Además, las posibilidades de éxito empresarial son bajas <sup>[12]</sup> debido a todas las pruebas y ensayos clínicos necesarios para sacar un fármaco al mercado. Una compañía puede tardar muchos años en desarrollar un antibiótico que se ponga a la venta, pero si finalmente lo consigue y éste es usado frecuentemente su uso quedará probablemente restringido a sólo un par de años debido a la aparición y dispersión de organismos resistentes generados por su uso desmedido <sup>[12]</sup>. Aunado a esto, si se llegase a encontrar un antibiótico extraordinariamente efectivo, es altamente probable que el personal médico sume esfuerzos

para limitar al máximo su uso; de forma que éste quede como reserva para casos de emergencia [12]. Por estas razones, la situación actual no es conveniente en términos monetarios para la farmacéutica que desarrolló el medicamento [12] sujetando el desarrollo de los mismos a las fluctuaciones del mercado. Esto nos puede orillar a una situación en la que cuando más necesitemos de ellos, no contemos con ningún antibiótico funcional disponible.

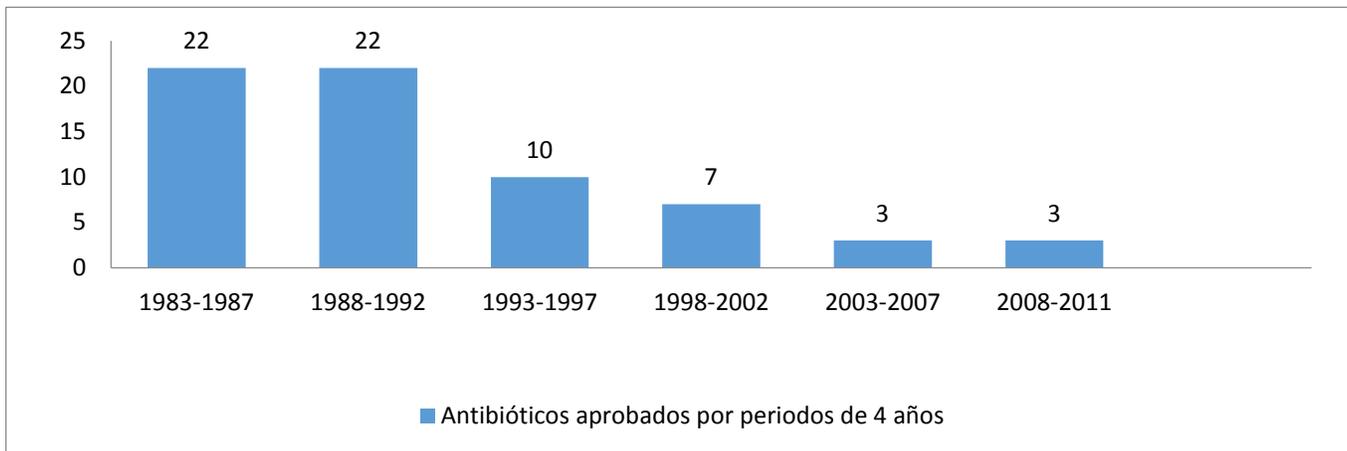


Figura 1.3. Antibióticos aprobados en los últimos años a nivel mundial. Actualizado [12].

En cuanto a la velocidad con la que aparece la resistencia bacteriana, ésta depende mucho de la concentración y la frecuencia con la que las bacterias están expuestas al antibiótico así como de su habilidad de modificar sus mecanismos de defensa [19, 20]. Por esto, la resistencia puede darse en años, meses, semanas o hasta en unos cuantos días. Pero en cuanto a la velocidad de dispersión de bacterias ya resistentes en la población humana, podemos ver claramente que la incidencia aumenta significativamente cada año (Figura 1.5) [12].

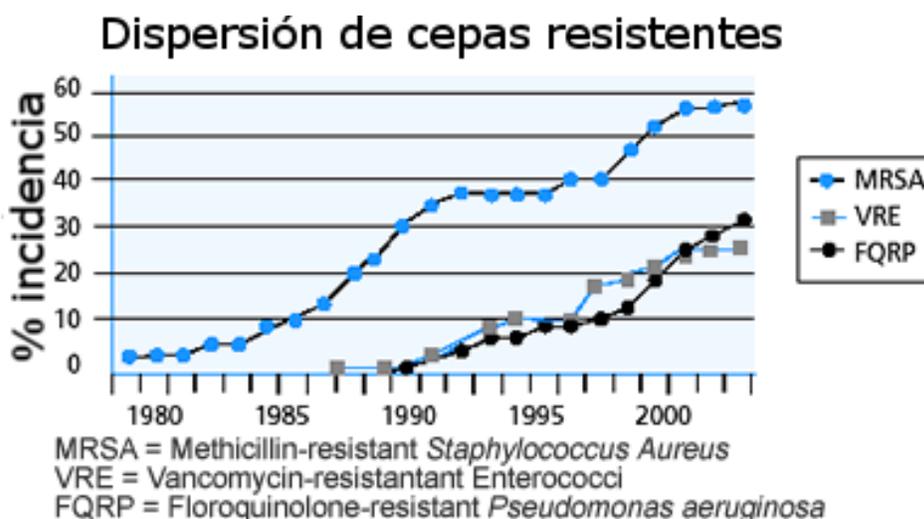


Figura 1.4. Tasas de dispersión de cepas resistentes a antibióticos reportadas por la CDC hasta el 2004. [12]

Entre las consecuencias más importantes de la aparición de infecciones resistentes está la dificultad de tratarlas y por lo tanto la necesidad de usar tratamientos cada vez más tóxicos, menos disponibles, más caros y de mayor duración que lo normal para las infecciones comunes <sup>[11]</sup>. Las infecciones resistentes al no poder ser tratadas fácilmente duran más en el paciente, generando así una mayor probabilidad de contagio <sup>[11]</sup>. La tuberculosis resistente, por ejemplo, tiene un tratamiento que puede durar hasta dos años, teniendo graves efectos secundarios <sup>[21]</sup>.

Lo que sabemos actualmente sobre la evolución de la resistencia a antibióticos, nos dice que el introducir un agente selectivo (matando a unas y dejando vivas a otras) como lo son los antibióticos, a una población en donde actúa la herencia y la variabilidad, generará tarde o temprano organismos adaptados a dicho agente <sup>[11, 13, 20]</sup>. Pero también, el entender este proceso nos permite sugerir una serie de lineamientos para desacelerar, dentro de lo posible, el surgimiento de bacterias resistentes:

- **No usar antibióticos para infecciones virales.** El hacerlo introducirá presión selectiva en las bacterias ya existentes en tu cuerpo, y beneficiará a aquellas resistentes; las cuales podrían tornarse patógenas, o transmitir dicha resistencia a alguna otra bacteria dañina. Es preferible mantener a nuestra comunidad bacteriana sin previo contacto con los antibióticos, de tal forma que si un día los necesitáramos, tenemos la posibilidad de que resulten efectivos <sup>[11, 17, 18]</sup>.
- **Evitar dosis pequeñas de antibióticos por periodos largos de tiempo.** Si la infección necesita del uso de antibióticos, lo mejor es recetar dosis altas por periodos cortos de tiempo. De esta forma, uno acaba con todas las bacterias sin dejar sobrevivientes medianamente resistentes. Procediendo posteriormente a reestablecer la flora nativa del cuerpo <sup>[11]</sup>.
- **Usar combinaciones de antibióticos.** Si uno se encuentra con una bacteria resistente a un antibiótico, darle dosis más altas de éste sólo fortalecerá la presión selectiva sobre la cepa, pudiendo provocar más tarde la aparición de una cepa (variante) súper resistente <sup>[19]</sup>. Las dos mejores opciones son las terapias combinadas (en donde se administran dos o más antibióticos al mismo tiempo) y las secuenciales (en donde se administra un antibiótico

primero y después el segundo) con evidencia de que la terapia secuencial es mucho mejor a largo plazo <sup>[23]</sup>.

- **Reducir el “uso preventivo” de antibióticos en ganado y cultivos.** Por las mismas razones mencionadas anteriormente, estos ambientes pueden favorecer la selección de bacterias resistentes, las cuales posteriormente pueden ser transferidas a la población humana <sup>[11, 14]</sup>.
- **Reducir el contacto con población vulnerable.** El salir a lugares públicos aumenta la posibilidad de contagio <sup>[11]</sup>.
- **Estar al día en la cartilla de vacunación.** El estar inmunizado contra enfermedades infecciosas previene el uso posterior de antibióticos <sup>[11]</sup>.

# 2

## Los mecanismos de resistencia a los antibióticos: específicos y no específicos.

En la naturaleza existen muchos mecanismos por los cuales una bacteria puede volverse resistente a los antibióticos <sup>[13, 24, 25]</sup>. Una manera general de clasificar estos mecanismos es distinguiendo entre aquellos que confieren resistencia a un sólo antibiótico (mecanismos específicos) y aquellos que le permiten a la bacteria contender contra varios antibióticos al mismo tiempo (mecanismos no específicos). A continuación se describirán a grandes rasgos las características y subcategorías de cada uno, así como sus posibles ventajas y desventajas.

### 2.1. *Mecanismos específicos*

Una resistencia a antibióticos específica es aquella que funciona para evitar los efectos nocivos de un antibiótico en particular. Esta resistencia se da cuando el organismo (en este caso la bacteria), posee una adaptación la cual reduce o elimina la efectividad del fármaco, permitiéndole sobrevivir, multiplicarse, y en principio, seguir causándole daño al paciente. Dichas adaptaciones pueden ser adquiridas de las siguientes formas <sup>[13, 25]</sup>:

- Naturalmente a través de *mutaciones* en el DNA (*transferencia vertical*).
- Mediante la adquisición de elementos de resistencia por contacto con otras bacterias (*transferencia horizontal*).

Explicaremos estos dos procesos con más detenimiento.

### 2.1.1 Mutaciones

Las mutaciones genéticas son aquellos cambios que alteran la secuencia de ADN y que son heredables [26]. Estos cambios pueden ocurrir de varias formas entre las cuales están:

- Los errores ocurridos en el proceso de **replicación** cometidos por la DNA polimerasa (enzima encargada de hacer copias del DNA).
- Los daños al DNA ocasionados por **radiación** o **agentes mutagénicos**.
- La **inserción** o **delección** de segmentos de DNA.

La mayor parte del tiempo estos cambios pasan inadvertidos al no modificar las características observables del organismo (**fenotipos**) [27]. Sin embargo estos cambios son reconocidos como una de las principales fuerzas evolutivas de la naturaleza, pudiendo llegar a afectar significativamente el funcionamiento de un organismo [27].

Dado que estos cambios pueden ser negativos, la célula cuenta con una maquinaria de reparación encargada de detectar dichas modificaciones y arreglarlas [26]. Pero como todo sistema, la eficiencia de reparación del DNA no es del 100% y algunos de estos cambios permanecen sin ser arreglados (pudiendo conllevar a cambios fenotípicos). En el caso de las bacterias, particularmente *E. coli*, se ha calculado que aproximadamente  $5 \times 10^{-10}$  errores permanecen por cada replicación de su genoma [28]. Esto corresponde a una mutación por cada cincuenta mil divisiones celulares. Este número puede sonar extremadamente bajo, pero dado el corto periodo de duplicación de *E. coli* (20 a 30 minutos por división), a una sola bacteria le tomaría menos de 16 generaciones alcanzar las cincuenta mil divisiones celulares. Esto significa que cinco horas y media de crecimiento exponencial (20m por división), son aproximadamente suficientes para que suceda una mutación [29]. Esto puede todavía no sonar como un gran número, pero una vez alcanzada esta cifra, en los siguientes veinte minutos (duplicación de 50mil a 100mil células) la población habría pasado por cincuenta mil procesos de duplicación adicionales, fijando así una nueva mutación. Siguiendo esta línea de pensamiento, en la próxima duplicación (100 mil a 200 mil células) dos nuevas mutaciones aparecerían, alcanzando las 6,710 mutaciones en un periodo de 8 horas.

Tomemos como ejemplo el intestino grueso humano. Sabemos que éste alberga alrededor de  $1 \times 10^{11}$  células bacterianas por mililitro y que tiene una capacidad cercana a los  $1000 \text{ cm}^3$ . Esto nos daría aproximadamente una población de aproximadamente  $10^{14}$  células bacterianas en nuestro intestino. Si ahora contamos el número de mutantes, éste sería de cerca de 2000 mutaciones ( $\frac{10^{14}}{5 \times 10^{10}}$ ) cada vez que nuestra microbiota intestinal se duplicara [29]. Extrapolando un poco estos datos y usando el hecho de que la probabilidad de encontrar células de *Pseudomonas aeruginosa* (Bacteria patógena en humanos) con resistencia a fluoro-quinolonas (antibiótico de uso común) es de  $1.2 \times 10^{-6}$  [30], podemos calcular que se necesitarían aproximadamente  $8.5 \times 10^5$  mutaciones para encontrar una célula con fenotipo resistente. Y dadas las tasas de mutación mencionadas anteriormente (2000 por duplicación poblacional), el encontrar una bacteria resistente llevaría poco más de 400 divisiones de nuestra flora intestinal para encontrar alguna célula capaz de resistir la presencia de un antibiótico de uso común como las fluoro-quinolonas.

Entre los ejemplos clásicos de resistencia a antibióticos derivado de mutaciones genéticas, está la resistencia a rifampicina. Su mecanismo de acción es a través de la inactivación de la enzima ARN polimerasa, mediante su unión a ésta. Y dado que esta enzima es la encargada de generar moléculas de ARN a partir de una cadena de ADN (en un proceso denominado *transcripción*) [27], las cuales en su mayoría serán posteriormente convertidas en proteínas (en un proceso conocido como *traducción*) [27], la célula muere a no poder llevar a cabo estos dos procesos esenciales para la vida. Ahora si una mutación logra afectar el gen de la ARN polimerasa de tal forma que al ser transcrita a ARN y luego traducida a proteína, su estructura no permita la unión de la rifampicina, se tiene una bacteria resistente [31].

### ***2.1.2 Transferencia Horizontal***

La transferencia horizontal es otro proceso por el cual las bacterias pueden adquirir resistencia específica a uno o más antibióticos [32]. Se le conoce como transferencia horizontal ya que es un mecanismo que se contrapone a la *transferencia vertical* en la cual la transmisión de material genético se da de padres a hijos [32, 33]. Las mutaciones que confieren resistencia son transmitidas de forma vertical (Ver Figura 2.1), mientras que la resistencia causada por la transmisión de DNA exógeno, es de forma horizontal [32, 33].

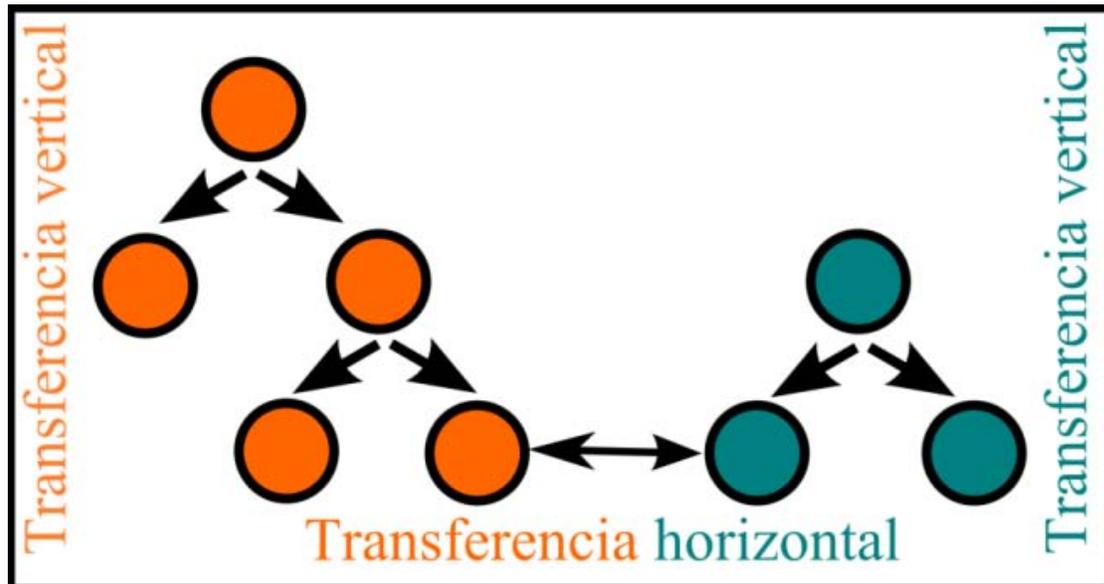


Figura 2.1 Transferencia horizontal V.S. Transferencia Vertical. Cada círculo representa una célula. Las flechas inclinadas indican una división celular en la cual el material genético se transmite verticalmente. El color de los círculos indica linajes distintos. La transferencia horizontal ocurre entre linajes celulares (naranja y verde), mientras que la vertical ocurre en el mismo linaje. La flecha bidireccional horizontal indica la transmisión de DNA de un linaje a otro. Adaptado <sup>[34]</sup>.

Las bacterias son organismos que pueden intercambiar (ceder y/o recibir) material genético con otras bacterias de su comunidad. La resistencia en este caso emerge por la adquisición de material genético *exógeno* que provee la capacidad de evitar los efectos nocivos de los antibióticos. Existen tres formas principales por las cuales las bacterias pueden adquirir material genético exógeno: la *transformación*, la *transducción* y la *conjugación* <sup>[34]</sup>.

La *transformación* <sup>[34]</sup> es el proceso mediante el cual una célula toma material genético del medio y lo incorpora al suyo. Éste proceso sucede naturalmente aunque puede ser provocado de forma artificial. En la naturaleza este proceso está controlado principalmente por condiciones nutricionales o de densidad poblacional <sup>[42]</sup>.

La *transducción* <sup>[34, 35]</sup> es otro proceso en el cual las bacterias pueden adquirir material genético que les confiera resistencia. En este caso la transferencia de DNA se da con la ayuda de un virus, por lo que las dos células que intercambian DNA no necesitan entrar en contacto físico.

Una de las ventajas que tiene este mecanismo sobre la transformación, es su insensibilidad a la presencia de DNAsas (enzimas encargadas de degradar DNA). Esto es gracias a que el DNA, al formar parte del virus, es protegido por la cubierta proteica/lipídica de éste. El proceso en términos simples sucede cuando un virus (*bacteriófago*) infecta a una bacteria y toma posesión de su maquinaria de replicación, transcripción y traducción para hacer muchas copias de sí mismo (*viriones*). Estas copias, a su vez, son capaces de infectar nuevas células bacterianas. Sin embargo al copiarse pueden ocurrir errores en los que parte del material genético del virus permanece en la célula bacteriana, o bien parte del material genético de la bacteria se introduce al virus. Esto provoca que la próxima vez que esas copias modificadas infecten a otra bacteria, el DNA de la célula de dónde salieron sea transferido a la recién infectada. Si la célula que recibe el DNA del virus/bacteria no es capaz de degradarlo, éste puede permanecer como un *plásmido* (partícula pequeña de DNA separada físicamente de los cromosomas) o bien integrarse al DNA cromosomal mediante un proceso conocido como *recombinación genética*.

Por último, en el caso de la *conjugación* <sup>[34, 36]</sup> el intercambio de material genético se da a través de una estructura en forma de ducto que conecta a las dos bacterias involucradas (receptora y donadora). Contrario a los dos casos anteriores, las bacterias sí necesitan entrar en contacto físico para intercambiar DNA. Debido a esto, la conjugación es comúnmente vista como el equivalente bacteriano a la reproducción sexual. Los elementos transferidos con mayor frecuencia por este mecanismo, son los plásmidos, los cuales comúnmente contienen genes para asegurarse que la bacteria receptora no posea ya un elemento similar; y resultan en su mayoría beneficiosos. De esta forma, la célula puede adquirir resistencia a antibióticos. También puede funcionarle para adquirir enzimas capaces de sintetizar o degradar nuevos compuestos, mejorando así su supervivencia.

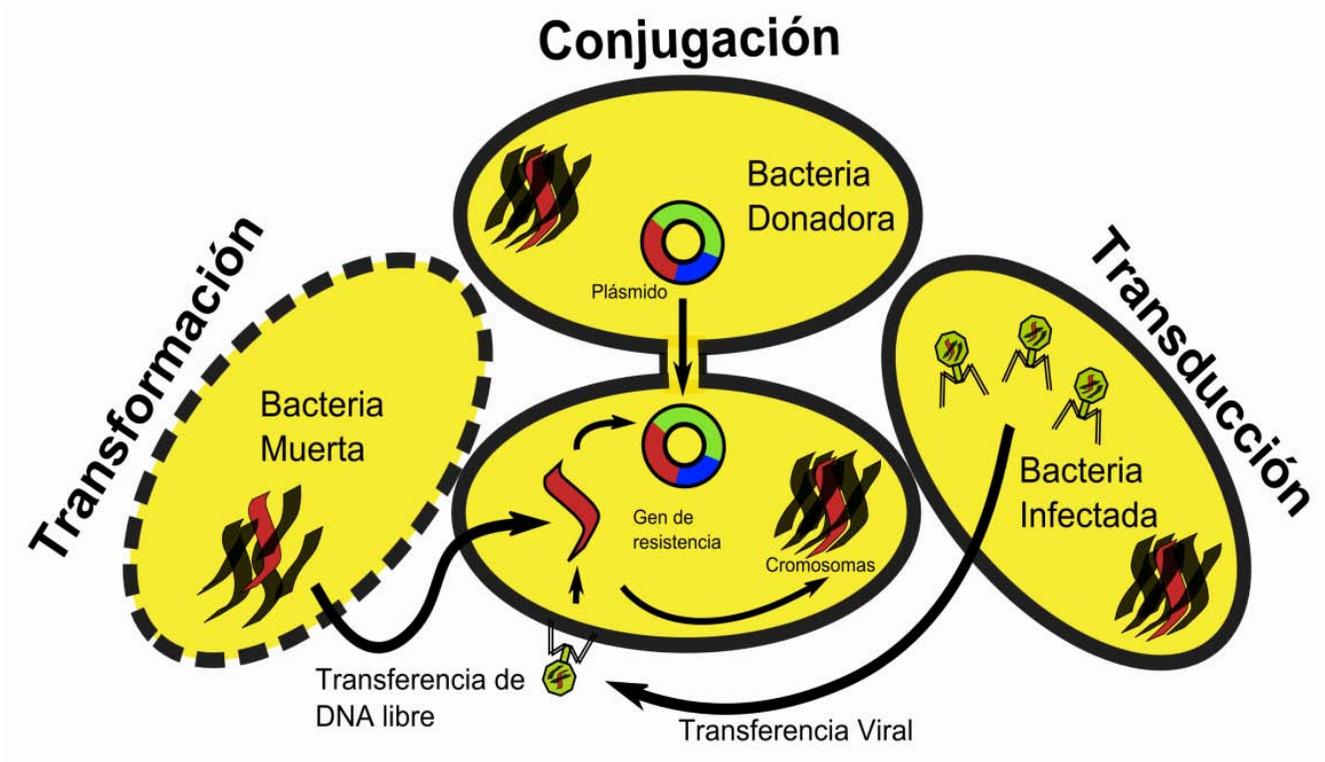


Figura 2.2. Mecanismos de Transferencia Horizontal. Adaptado [34].

Ya sea a través de mutaciones o por la adquisición de DNA exógeno, la bacteria puede obtener la capacidad de resistir la presencia de antibióticos [37]:

- Neutralizando la acción del antibiótico antes de que la mate.
- Modificando el blanco de ataque del antibiótico.
- Adquiriendo un reemplazo de la enzima afectada, de tal forma que el antibiótico no interfiera con el metabolismo de la bacteria

## ***Bacterias Gram Negativas y Gram Positivas.***

Las bacterias pueden ser clasificadas de muchas formas. Sin embargo la clasificación más común y con relevancia en cuanto al desarrollo de resistencia a antibióticos, es la **tinción de Gram** [38]. Este método permite diferenciar entre grupos de bacterias que retienen, o no, el cristal violeta. Este compuesto es un tinte usado para detectar la presencia de peptidoglicanos en la pared celular. Si la bacteria resulta teñida, la bacteria es clasificada como Gram-Positiva y en caso contrario como Gram-Negativa. Pertenecer a una u otra clase tiene importantes implicaciones en cuanto a los niveles de resistencia que ésta puede desarrollar [12].

Por un lado, las bacterias **Gram-Positivas** cuentan con una capa externa de peptidoglicano la cual funciona como una barrera para impedir el paso a algunos agentes antimicrobianos (dicha capa es la responsable de retener el tinte durante la tinción de Gram) [38]. No obstante, a pesar de poseer esta gruesa capa protectora, las bacterias Gram-Positivas son mucho más susceptibles a antibióticos, comparado con las Gram-Negativas, debido a que muchos antibióticos atacan justamente esta estructura. Contrario a lo que uno podría pensar, las bacterias **Gram-Negativas** también cuentan con una capa de peptidoglicano. Sin embargo dicha capa es mucho menos gruesa y se encuentra embebida entre dos membranas lipídicas; una citoplasmática (interna) y otra externa. Por lo mismo, estos peptidoglicanos en principio reconocibles por la tinción de Gram, no son alcanzados por el cristal violeta o bien por los antibióticos que la podrían destruir. Además de esto, la doble membrana lipídica presente en las bacterias Gram-Negativas cuenta con **porinas** (canales por los cuales se puede filtrar qué entra y qué sale de la célula), las cuales funcionan como un fantástico filtro para aquellas moléculas tóxicas o indeseables [37]. Por ésta razón, las bacterias Gram-Negativas son significativamente más difíciles de combatir con antibióticos que podrían dañar la capa de peptidoglicano o bien la membrana lipídica interna de la célula (como la lisozima y la penicilina). Estas características provocan que el desarrollo de antibióticos para esta clase sea significativamente más difícil, pero por lo mismo, extremadamente necesario [11, 12].

Un claro ejemplo de las diferencias entre las dos clases se observó en un experimento realizado con antibióticos naturales, el cual encontró que el 90% de ellos sólo tenía efecto en Gram-Positivas, mientras que las bacterias Gram-Negativas (*E. coli* por ejemplo) resultaron inmunes a ellos; situación muy similar a lo que sucede con antibióticos sintéticos o semi-sintéticos [39, 40, 25].

**Nota:** La susceptibilidad de una bacteria a los antibióticos, se mide a través de la concentración inhibitoria mínima o **MIC** (Minimum Inhibitory Concentration), la cual nos indica la concentración más baja de antibiótico que es capaz de inhibir el crecimiento visible de la población tras haber sido dejada en cultivo toda una noche.

## ***2.2. Mecanismos inespecíficos y la Resistencia a múltiples fármacos***

La resistencia a múltiples fármacos hace referencia a aquella que le confiere a la bacteria la capacidad de contrarrestar el efecto de muchos antibióticos al mismo tiempo [25]. Este tipo de resistencia puede ser adquirida mediante una acumulación gradual de mutaciones y transferencias horizontales de resistencias específicas, o bien mediante la adquisición de resistencias inespecíficas. El ejemplo más importante de este tipo es la producción de bombas de eflujo [40].

### ***2.2.1. Las Bombas de Eflujo***

El mecanismo de resistencia debido por las bombas de eflujo es significativamente distinto a los mencionados anteriormente, pues para que la bacteria presente el fenotipo resistente no se necesitan forzosamente mutaciones o la adquisición de nuevo material genético. Muchas bacterias, principalmente las Gram-Negativas (ver apartado: Bacterias Gram Negativas y Gram Positivas), cuentan por defecto con una protección a agentes externos basada en la producción de proteínas que conectan el interior y el exterior de la célula [40]. Estas proteínas son denominadas bombas de eflujo y expulsan activamente una gran cantidad de sustancias tóxicas. En muchos casos esta defensa va acompañada de una menor producción o cierre de porinas, con el fin de evitar que el antibiótico entre de nuevo a la célula [40,41]. La activación de esta respuesta resistente, en general, se da tras el contacto con un agente antimicrobiano [41].

Es sabido que las bombas de eflujo (el sistema principal de transporte de sustancias tóxicas) tienen otras funciones aparte de expulsar antibióticos [41]. Se sabe, por ejemplo, que funcionan también para establecer gradientes de PH o bien para expulsar intermediarios metabólicos y otro tipo de agentes dañinos como las sales biliares [41]. Esto resulta particularmente interesante, ya que dada la alta especificidad de las bombas hacia estas sales, y también por su alta concentración en el intestino humano (el ambiente natural de *E. coli*), se ha propuesto que las bombas de esta bacteria han sido seleccionadas con el objetivo principal de deshacerse de estos compuestos y no de antibióticos [40].

La clasificación de bombas de eflujo depende de muchos factores. Mientras que algunas bombas utilizan ATP como fuente de energía, otras funcionan acoplado el

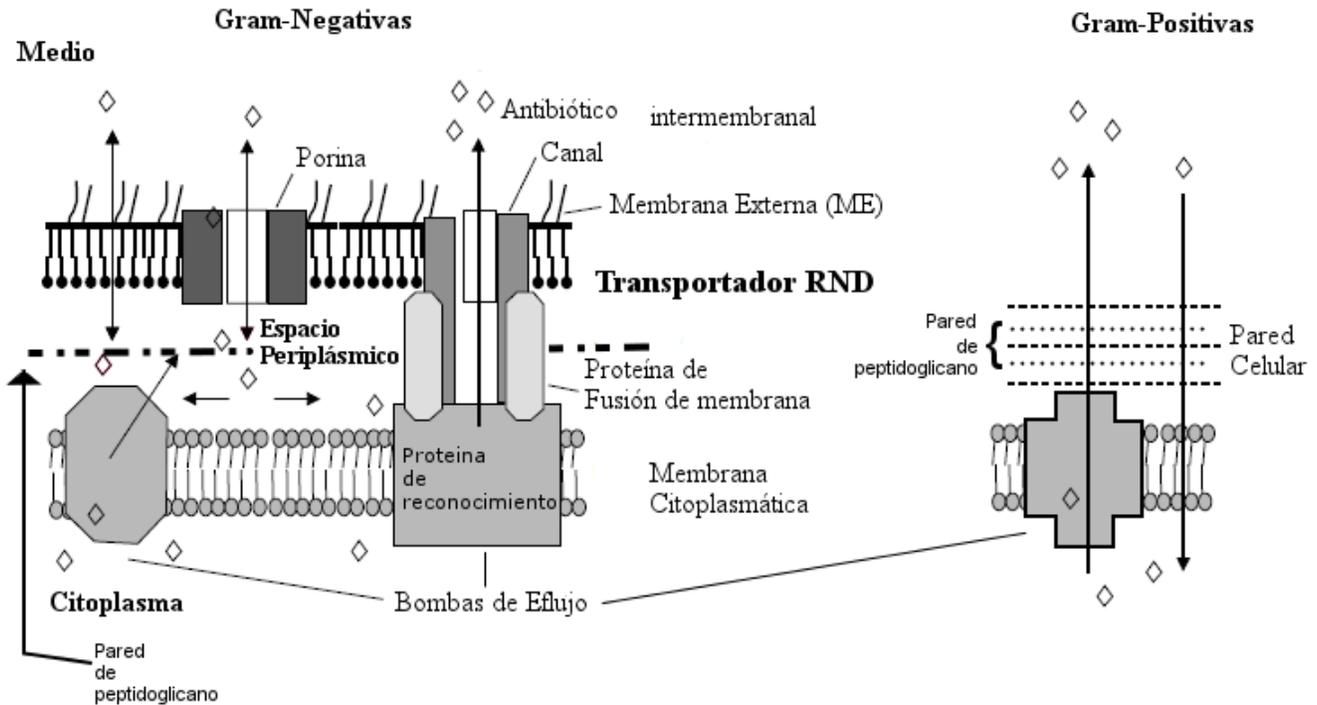
compuesto que quieren expulsar a algún ion como el Hidrógeno (de tal forma que éstos se muevan debido a un gradiente de cargas) <sup>[41]</sup>. Además existe una amplia diversidad estructural y de funcionamiento, así como un sesgo en el tipo de sustratos que reconocen. Por lo tanto, basándose en todas estas diferencias, la clasificación más general de las bombas de eflujo, contiene cinco grandes familias <sup>[41]</sup>:

- **SMR** (*Small Multidrug Resistance*). En este grupo, las bombas tienen un tamaño pequeño y en su mayoría utilizan el acoplado a iones (Proton Motif Force o PMF) como mecanismo de transporte. A pesar de que son considerados como sistemas de transporte de múltiples fármacos, sus sustratos están limitados a cationes lipofílicos, antisépticos y desinfectantes.
- **MFS** (*Major Facilitator Super family*) o Súper familia facilitadora. Este grupo transporta principalmente azúcares, metabolitos, aniones y algunos fármacos. Su fuente de energía es también la PMF y en general tienen un solo componente de membrana. En esta familia podemos encontrar tanto transportadores específicos como transportadores de múltiples compuestos.
- **RND** (*Resistance Nodulation Division*) o División de Nodulación y Resistencia. Esta familia es la más importante en cuanto a resistencia a múltiples fármacos se refiere. Los transportadores de esta familia se dividen a su vez en 7 subfamilias y se encuentran tanto en bacterias como en eucariontes. Los genes que codifican para la gran mayoría de estos transportadores se encuentran en los cromosomas y en muy pocas ocasiones en plásmidos. Estos transportadores usualmente forman complejos con proteínas de fusión de membrana, o bien, se encuentran embebidos en la membrana externa. Esta conexión entre las dos membranas les permite expulsar sustratos desde el citoplasma hasta el exterior de la célula y todas las bombas de ésta familia son transportadoras de múltiples fármacos.

- **ABC** (*ATP Binding Cassette*) o Casete de unión a ATP. Esta clase de transportadores utiliza la hidrólisis de ATP como fuente de energía. Transportan principalmente azúcares, aminoácidos, complejos de hierro, polisacáridos, proteínas, iones y algunos fármacos. Cabe mencionar que son uno de los tipos de transportadores menos comunes en bacterias.
- **MATE** (*Multidrug and Toxin Extrusion*) o Extrusión de múltiples fármacos y toxinas. Esta familia tiene una constitución similar a la MFS, pero no presenta similitud significativa en cuanto a secuencia nucleotídica o de aminoácidos. Su principal función es transportar tintes, aminoglicósidos y floroquinolonas usando la PMF (ocupando usualmente el ion sodio Na<sup>+</sup>).

Todos estos sistemas de transporte pueden estar asociados tanto a los cromosomas de la bacteria como a sus plásmidos. Sin embargo ocurre con frecuencia que los sistemas de bombeo, codificados en plásmidos (y por lo tanto transferibles de bacteria a bacteria), confieren resistencia a antibióticos específicos <sup>[41]</sup>. Pero por el contrario, los sistemas de bombeo que forman parte de los cromosomas del organismo usualmente confieren resistencia a varios compuestos al mismo tiempo, aunque el hecho de estar embebidos en un cromosoma dificulta su transferencia horizontal <sup>[43]</sup>. El fenotipo resistente por bombeo se presenta por la activación de éstos transportadores a través de compuestos externos (el antibiótico por ejemplo), la amplificación genética (el organismo cuenta o genera más de una copia del sistema de transporte), o bien mutaciones que afecten su regulación y por lo tanto su expresión <sup>[43]</sup>.

La resistencia innata a antibióticos en la familia de las Gram-Negativas se debe principalmente a la presencia de éstos sistemas de transporte, siendo las más importantes aquellas pertenecientes a la familia RND <sup>[25, 43]</sup>.



**Figura 2.3. Figuras esquemáticas de bombas de eflujo para bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las flechas indican el flujo de antibiótico a través de las bombas de eflujo. En el diagrama central se muestra una representación de los transportadores RND. Adaptado [43]**

De hecho otra de las diferencias importantes entre las bacterias Gram-Positivas y las Gram-Negativas es en cuanto a los tipos de bombas que poseen. Mientras que las bacterias Gram-Positivas cuentan solamente con transportadores de las clases ABC, MFS, y SMR, las bacterias Gram-Negativas poseen transportadores pertenecientes a las cinco categorías [43]. A pesar de esto, no todas son igual de importantes en cuanto a la resistencia a antibióticos se refiere, pues los transportadores SMF y los MFS expulsan mayoritariamente tintes y sólo algunos pocos antibióticos. Por el contrario, las bombas pertenecientes a la familia RND además de reconocer una amplia variedad de sustratos son los transportadores predominantes en cuanto a la expulsión de antibióticos [43]. Por esta razón describiremos las bombas RND con más detalle.

Los transportadores RND usualmente son complejos multiprotéicos que cuentan con un **canal intermembranal**, una **proteína de reconocimiento** y una **proteína de fusión de membrana** que une a las dos anteriores (ver transportador central de la Figura 9). Esta

conformación le permite a la célula expulsar fármacos desde el citoplasma o del espacio periplásmico, directamente al exterior <sup>[43]</sup>. Debido a que la mayoría de las bacterias que tienen este tipo de bombas cuentan además con una membrana lipídica externa, los fármacos que son expulsados no pueden entrar de nuevo tan fácilmente, haciéndolas excepcionalmente resistentes a los antibióticos más comúnmente usados <sup>[12, 43]</sup>.

Un dato interesante sobre los transportadores RND es el hecho de que su activación promueve una resistencia extra a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y aminoglicosidos. Sucede que una de las formas más comunes de que una bacteria adquiera resistencia a éstos antibióticos es mediante la adquisición de  $\beta$ -lactamasas (conjunto enzimas que degradan a esta clase antibióticos). Sin embargo estas enzimas pueden ser inhibidas químicamente, haciendo que la bacteria supuestamente resistente, se torne susceptible de nuevo. No obstante, tanto los  $\beta$ -lactámicos como las aminoglicosidas son expulsadas por bombas de la familia RND, haciendo que aun cuando las  $\beta$ -lactamasas sean inactivadas, la bacteria siga siendo resistente <sup>[43]</sup>.

### **2.2.2. El sistema *AcrAB-TolC* como mecanismo de resistencia**

En 1965 Nakamura descubrió que una mutación cromosomal (conocida ahora como “mutación *acr*”) volvía a *E.coli* extremadamente susceptible a tintes, detergentes y antibióticos de muy distintas estructuras y con blancos igualmente distintos. Este fenotipo claramente no podía ser una resistencia específica y en un principio se creyó que estaba relacionado con la permeabilidad de la membrana. Sin embargo esta hipótesis fue prontamente descartada al no encontrar ningún tipo de alteración en ella <sup>[25]</sup>. Posteriormente, gracias a las técnicas de clonación y secuenciación, se logró determinar que esta mutación caía en el locus *acrAB*, el cual codificaba para una lipo-proteína de membrana interna (*AcrA*) y para una proteína asociada a membrana (*AcrB*). Estas dos proteínas a su vez estaban asociadas con el bombeo de acriflavina y dicha mutación afectaba la efectividad de dicho bombeo. Actualmente el sistema *acrAB* es uno de los sistemas RND mejor conocidos y que por sí solo es capaz de conferir a las bacterias resistencia a múltiples fármacos <sup>[25]</sup>. Sabemos ahora que *AcrA* y *AcrB* funcionan conjuntamente con un canal de la membrana externa llamado *TolC*, formando un “transportador tripartito” con una de las mayores diversidades de sustratos conocida hasta la fecha y presente en un gran número de bacterias <sup>[45, 46]</sup>.

El sistema AcrAB-TolC es uno de los sistemas más importantes de *E. coli* para la expulsión de antibióticos. Si uno inactiva este sistema, tanto en *E. coli* como en *Salmonella entérica*, la susceptibilidad a antibióticos aumenta considerablemente en ambas bacterias volviéndolas igual de sensibles que una bacteria Gram-Positiva [43]. Por ejemplo, cuando ésta bomba se inactiva, y se le añade al medio oxacilina (una penicilina en principio funcional solo para Gram-Positivas), el MIC decrece de 256 µg/ml a tan solo .5 µg/ml, con efectos similares en la novobicina, eritromicina y el ácido fusídico [43].

Un estudio sobre la especificidad de este sistema de transporte reveló que a pesar de funcionar como un fantástico mecanismo de resistencia a antibióticos, ésta no es su función fisiológica principal. Analizando la afinidad que tiene AcrB a varios compuestos, se demostró que ésta bomba presentaba una afinidad de un orden de magnitud mayor a compuestos como sales biliares que con respecto a antibióticos tales como la eritromicina o la cloxacilina. Esto sugiere nuevamente, que a lo largo de la evolución ésta bomba se especializó en expulsar sales biliares, que son las toxinas con mayor presencia en los intestinos (hábitat más común de las bacterias que lo poseen) [47].

*E.coli* también cuenta con otras bombas pertenecientes a la familia RND. Entre estos sistemas están: el sistema AcrEF, AcrD, YhiUV y el MdtABC. Estos también expulsan algunos antibióticos y usan el mismo canal intermembranal (TolC). Sin embargo se ha observado que al inactivar los genes encargados de producir estas otras proteínas, la bacteria no presenta ningún cambio en la susceptibilidad a antibióticos (al menos no en condiciones estándar de crecimiento) [43]. Esto nos indica que estos sistemas no se expresan significativamente en condiciones silvestres ordinarias. Por el contrario, sabemos que si se inactiva el gen encargado de producir la proteína de membrana AcrB, la bacteria se vuelve extremadamente susceptible a antibióticos, indicando que éste es al menos uno de los sistemas más importantes involucrados en la resistencia innata a antibióticos de *E.coli* [25, 43].

Para entender mejor el funcionamiento de este sistema de resistencia a múltiples fármacos, hablaremos en los siguientes capítulos sobre su regulación genética y los fenómenos en los cuales está involucrado.

# 3

## El locus *mar* y la resistencia adaptativa

### 3.1. *El descubrimiento*

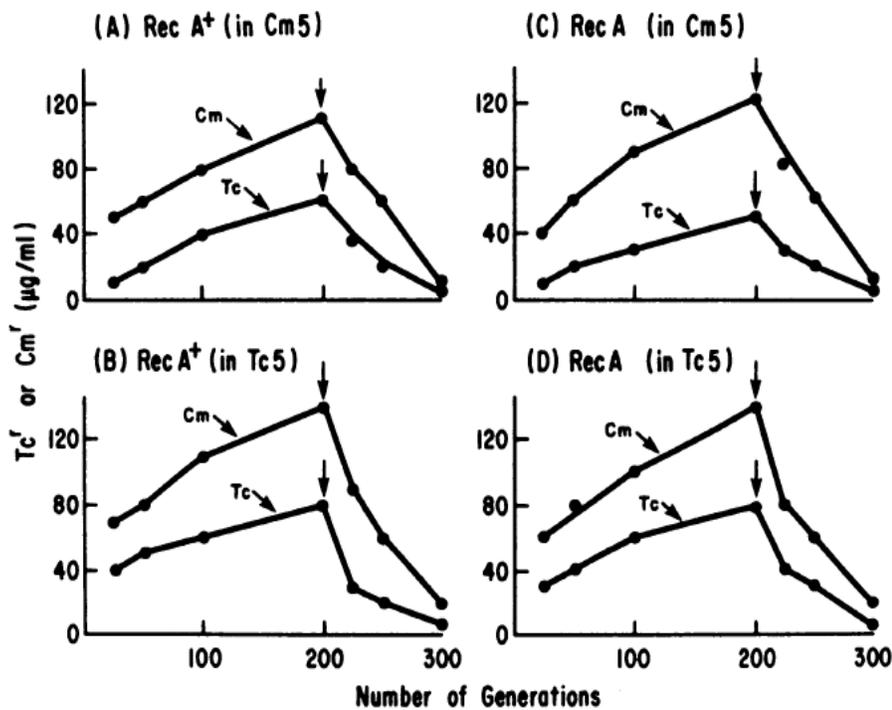
La historia de la resistencia adaptativa empieza alrededor de los años 80's en el laboratorio de Stuart Levy con el descubrimiento del **locus *mar*** (**m**ultiple **a**ntibiotic **r**esistance **l**ocus) [25]. Todo inició cuando su grupo de trabajo se dispuso a analizar el crecimiento de bacterias al ser sometidas a concentraciones bajas

de antibióticos. Observaron que las células de *E.coli* podían no sólo sobrevivir, sino crecer en platos de agar a los cuales se les había agregado una concentración baja de tetraciclina (~1µg/ml) [44]. Sorprendentemente, estas poblaciones además podían ser entrenadas para incrementar gradualmente su resistencia mediante un aumento paulatino de la concentración de antibiótico en el medio. Es decir que una vez que la población de bacterias resistentes empezaba a crecer en la concentración inicial de antibiótico, ésta se incrementaba ligeramente. Una vez que las células se adaptaban a esta nueva concentración y empezaba a notarse un crecimiento celular claro, se volvía a aumentar la concentración de antibiótico. Siguiendo estos incrementos sucesivos, lograron obtener en muy poco tiempo poblaciones de bacterias hasta 20 veces más tolerantes a tetraciclina que la cepa silvestre (200µg/ml v.s. el MIC silvestre de 10µg/ml). También observaron que este proceso podía ser reproducido con otros antibióticos; iniciando, por ejemplo, con concentraciones de 5µg/ml de cloranfenicol y llegando gradualmente a los 400µg/ml) [44].

**Locus:** se define como un segmento específico de ADN en el cromosoma.

En estos experimentos también se observó que las bacterias presentaban resistencia no sólo al antibiótico particular con el cual habían sido entrenadas, sino que presentaban al mismo tiempo resistencia a otros antibióticos con los cuales no habían tenido contacto previo. Es decir, que las bacterias que vivían inafectadas por las altas concentraciones de tetraciclina o cloranfenicol, presentaban resistencia también a ácido nalidixico, puromicina, rifampicina y  $\beta$ -lactámicos sin haber sido expuestas a ellos [44]. Este fenómeno en el cual la resistencia a un antibiótico afecta la resistencia a otro es conocido como **resistencia cruzada** [48] y significa grandes dificultades médicas [48, 49].

Sin embargo, si una vez alcanzado un nivel considerable de resistencia la población era cambiada a un medio carente de antibiótico, la resistencia se perdía en unas cuantas generaciones, sugiriendo que el mecanismo que la confería era particularmente inestable (Figura 3.1).



**Figura 3.1 Amplificación y Reversibilidad de la Resistencia a tetraciclina y a cloranfenicol en cepas silvestres y mutantes en RecA (proteína de reparación del DNA). La población fue sometida a concentraciones de cloranfenicol (Cm5) (paneles A y C) o a tetraciclina (Tc5) (paneles B y D) a 5µg/ml por 200 generaciones a 37°C. Después el antibiótico fue removido del medio (flecha vertical) durante 100 generaciones. A lo largo del experimento se midieron los niveles de resistencia para ambos antibióticos. Cada punto indica los niveles del antibiótico en cuestión para los cuales más del 80% de la población pudo sobrevivir. Puede observarse que la presencia o ausencia de RecA no modifica el comportamiento [44].**

Otro descubrimiento importante de este fenotipo resistente, fue que no dependía de la presencia de plásmidos (ver plásmidos en Capítulo II). Y a pesar de que en aquella época no se conocían otros mecanismos de adquisición de resistencia aparte de las mutaciones y la transferencia horizontal, se mencionó que las tasas de adquisición de resistencia observadas (en tan solo 200 generaciones) eran demasiado altas para deberse a cambios en la secuencia del ADN [44]. Actualmente, a esta resistencia múltiple, adquirida de forma

gradual, sin cambios en el material genético y que además es reversible, se le conoce como **resistencia adaptativa** [50].

Posteriormente, Stuart Levy y su grupo al intentar descubrir qué genes estaban involucrados en la expresión del fenotipo resistente, identificaron que toda la fenomenología observada dependía de la expresión de un locus conocido actualmente como “locus *mar*” [25]. Cuando se alteraba este sitio mediante la inserción de un transposón (elemento móvil de ADN), las bacterias no sólo no podían incrementar sus niveles de resistencia, sino que se volvían mucho más susceptibles a los antibióticos, comparados con la cepa silvestre. Estos resultados les llevaron a la conclusión de que aún en la ausencia de antibióticos el locus *mar* era expresado y que éste resultaba indispensable para observar el fenómeno de resistencia. Tiempo después de haber identificado este locus, mediante técnicas de secuenciación y clonación de DNA, se identificaron en él los genes *marA* y *marR* de los cuales hablaremos con detenimiento más adelante (ver sección: *El locus Mar como mediador del fenotipo resistente*). Basta saber por el momento que cepas de *E.coli* que sobre expresan *marA*, son hasta 50% menos susceptibles a triclosan y otros antibióticos; fenotipo a su vez correlacionado con la sobre expresión de las ya mencionadas *AcrA* y *AcrB* [25].

### 3.2. *Herencia epigenética y reversibilidad*

La historia de la resistencia adaptativa continúa años más tarde con una serie de experimentos muy similares a los realizados en el laboratorio de Stuart Levy, pero conducidos ahora por Adam y su grupo experimental [30]. La motivación principal era entender la formación de colonias satelitales en ambientes con bajas concentraciones de antibiótico. La observación inicial fue que cuando un conjunto de células contiene un plásmido de resistencia, como a la ampicilina, es común que éstas puedan reducir la concentración o toxicidad del agente en su alrededor, permitiendo que otras bacterias carentes del plásmido sobrevivan en su vecindad inmediata. No obstante, observaron que algunas pocas células podían sobrevivir fuera de esta zona “segura” sin ser poseedoras del plásmido. Estas colonias tenían un tamaño mucho más pequeño y se encontraban a una distancia considerable del conjunto de células ayudadas por el plásmido (de aquí el nombre de colonias satelitales) [30].

Para estudiar este fenómeno realizaron un experimento que consistió en poner una población *isogénica* (todas descendientes de la misma célula y por lo tanto con una similitud genética, en principio, absoluta) de *E. coli* en platos de agar con diferentes concentraciones de ampicilina. Al analizar las tasas de supervivencia en cada uno de los platos, observaron que aún en aquellas concentraciones por debajo del MIC reportado (menores a 2.5 µg / ml), existía una muy baja tasa de supervivencia (sólo 21% de las células sobrevivía en 1 µg / ml) y que estas células usualmente formaban colonias satelitales. Esto reflejaba que a pesar de tener presumiblemente la misma información genética, existía una alta variabilidad fenotípica en la población que podía ser sometida a un proceso de selección [30]. Es importante mencionar que este porcentaje resultó, al igual que en los experimentos de Stuart Levy, demasiado alto para poder ser explicado por puras mutaciones genéticas (las tasas de mutación esperadas en una población de *E. coli* son de alrededor  $10^{-5}$  a  $10^{-10}$ ). Es en base a estas observaciones que Adam y su grupo proponen que debe existir otro mecanismo capaz de generar la suficiente diversidad fenotípica en la población, sin la necesidad de generar variación genotípica, que permita a unas células sobrevivir y a otras no [30].

De forma similar a los experimentos de Levy, el grupo de Adam observó que los niveles de resistencia de estas colonias podían ser aumentados considerablemente al exponerlas a incrementos en la concentración de antibiótico y que este fenotipo resistente era bastante inestable cuando el antibiótico era removido del medio. Sin embargo, en lugar de seguir la línea de las mutaciones genéticas, ellos proponen que la rápida aparición y baja estabilidad de la resistencia, concuerda con un mecanismo de variabilidad y herencia epigenética [30]. Siendo un mecanismo epigenético aquél capaz de influenciar el fenotipo del organismo, y ser heredable, sin conllevar a cambios en la secuencia de DNA (ver apartado: Mecanismos de herencia epigenéticos) [51].

De ésta forma, la selección artificial causada por los incrementos graduales en la concentración de antibiótico en conjunto con la variabilidad fenotípica intrínseca del mecanismo epigenético, provocaría que la población sea cada vez más resistente seleccionando sólo a aquellas capaces de resistir la nueva concentración de antibiótico una y otra vez (Figura 3.2).

*La propuesta más importante de éste trabajo, es que dicho mecanismo epigenético es el responsable de generar la suficiente diversidad fenotípica en la población, de tal forma que exista en ella al menos un conjunto de bacterias capaces de sobrevivir a una concentración más alta de antibiótico que sus congéneres.*

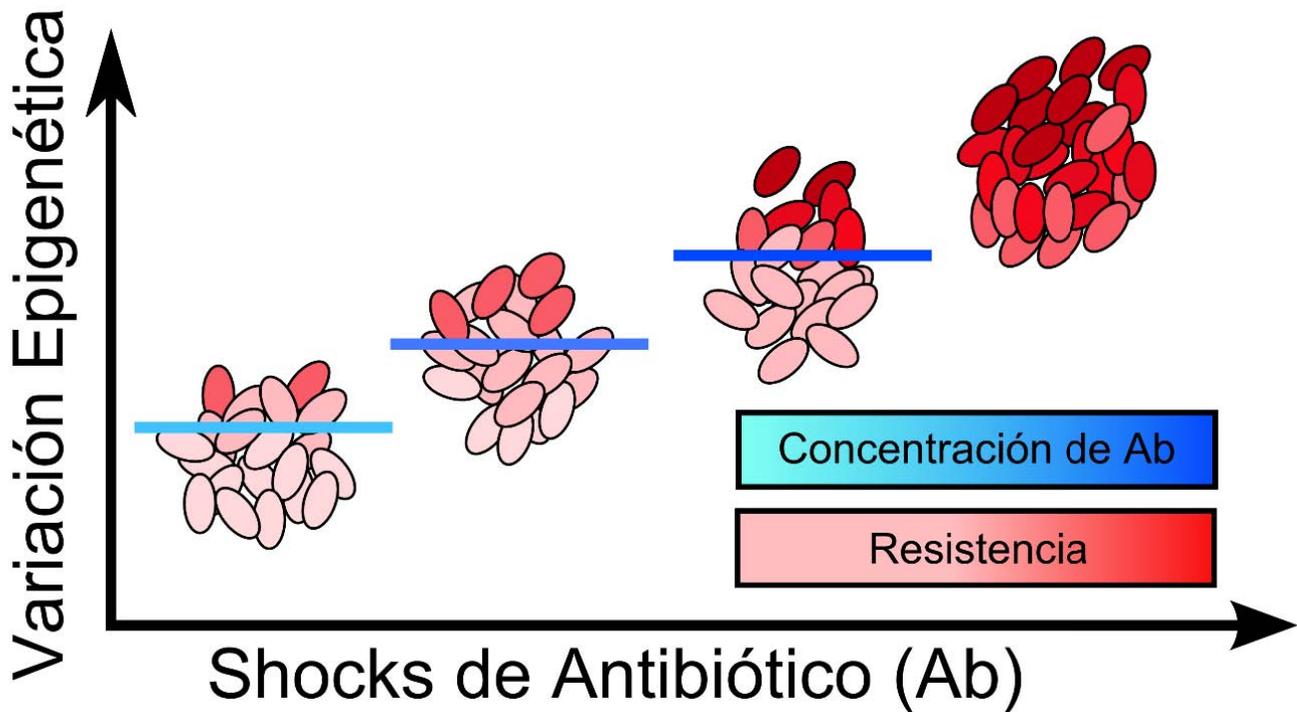


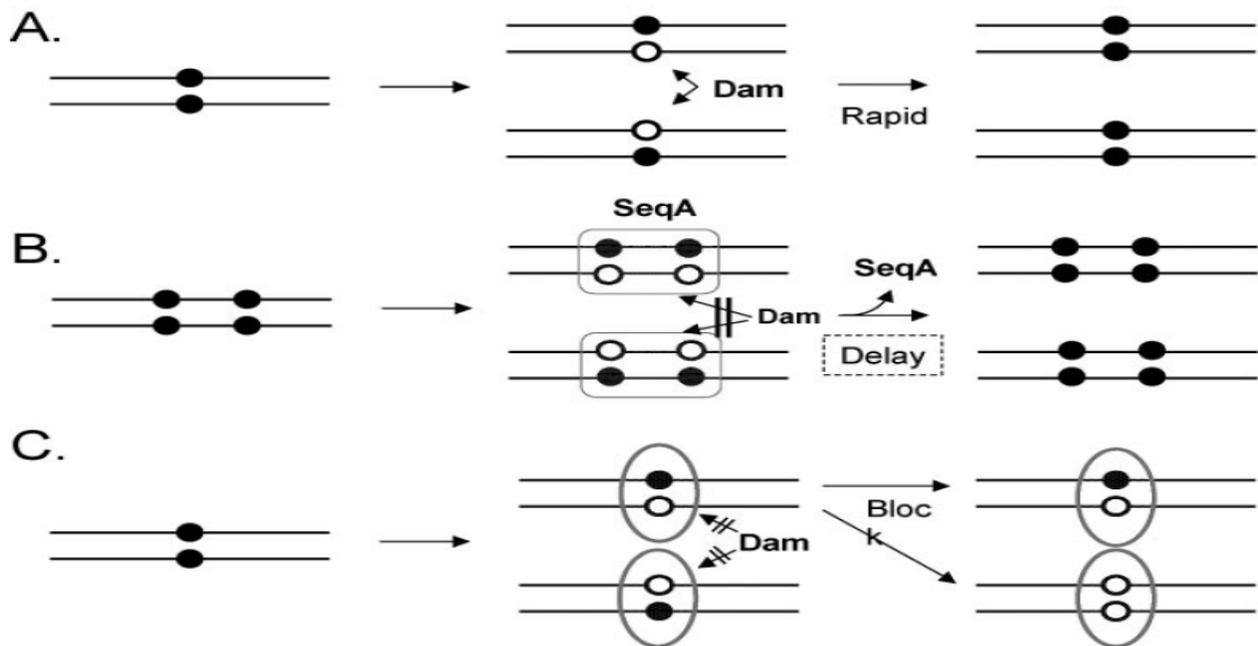
Figura 3.2 Modelo de la evolución de la resistencia a antibióticos por herencia epigenética. Aún dentro de una población isogénica, existe variación en la expresión genética (eje Y). Cuando se introduce antibiótico al medio (Líneas azules horizontales) sólo pueden sobrevivir aquellas células con un determinado patrón de expresión. Una sucesión de ésta selección artificial, mezclada con variabilidad y herencia epigenética puede generar poblaciones con patrones de expresión genética que les permitan resistir concentraciones cada vez más altas de antibiótico. Rediseñado [30].

Proponen también que un mecanismo epigenético que podría estar detrás de esta variabilidad fenotípica, y por lo tanto ser responsable de la aparición del fenotipo multi-resistente, es la metilación del ADN (ver apartado: Mecanismos de herencia epigenéticos). Más específicamente y basados en su mecanismo de acción, proponen que la desoxiadenosin-metil transferasa (DAM) podría ser un buen candidato.

**DAM: Desoxi-adenosin metil transferasa.** El gen de la DAM contiene 834 pares de bases y codifica para una proteína monomérica de 32 kilo-Daltones. Ésta proteína está presente en múltiples especies tales como: *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Haemophilus influenzae*, así como en una gran cantidad de bacterias gram-negativas.

Las razones por las cuales la DAM resulta atractiva como responsable de la herencia y de la variabilidad epigenética son varias. Por un lado está el hecho de que los patrones de metilación que genera pueden ser heredados y pueden sufrir cambios de una generación a otra. Es sabido que la DAM reconoce los sitios de ADN con la secuencia “GATC”<sup>[52]</sup>. Una vez que reconoce este patrón, el cual se estima que ocurre aproximadamente 18,000 veces en todo el genoma de *E. coli*, DAM procede a añadir un grupo metilo en la adenina de dicha secuencia. Dado que en la cadena complementaria la secuencia es palindrómica (CTAG « GATC), ésta puede ser igualmente reconocida y por lo tanto metilada. Durante el proceso de replicación del ADN, las dos cadenas se separan y cada célula se queda con una cadena vieja (metilada) y una recién sintetizada (no metilada), la cual la mayor parte de las veces será inmediatamente metilada por DAM. Sin embargo, debido a que este proceso no está exento de errores/modificaciones, el patrón de metilación resultante para una o ambas cadenas, puede ser distinto al de la cadena original (Figura 3.3). Dado que se sabe que distintos patrones de metilación pueden llevar a distintos estados de expresión genética<sup>[53]</sup>, el hecho de que dos células difieran en sus patrones de metilación puede hacer que su capacidad de resistir a la presencia de antibióticos sea distinta, generando así variabilidad fenotípica en la población.

Una razón más por la cual resulta atractiva la propuesta de la metilación por DAM como mecanismo responsable de la aparición del fenotipo resistente, es que al explorar su posible papel en la aparición de la resistencia adaptativa, se encontró que aquellas células que carecían de DAM eran cinco veces más susceptibles a la presencia de ácido nalidíxico [30]. Además, al estudiar la diferencia en los patrones de expresión genética entre células que carecían de DAM y células normales, encontraron que entre los elementos más afectados por su ausencia, están genes encargados de regular la producción de las bombas de eflujo mencionadas anteriormente [30].



**Figura 3.3. Generación de distintos patrones de metilación por DAM.** A) Al replicarse el ADN con dos sitios metilados, cada cadena resultante queda hemimetilada. Al encontrar estos sitios hemimetilados, DAM procede a metilarlos, reestableciendo el patrón inicial. B) Cuando dos o más sitios “GATC” se encuentran adyacentes, SeqA puede unirse a ellos temporalmente, evitando la metilación por DAM y manteniendo el estado hemimetilado por un determinado tiempo. Una vez que SeqA se despega, DAM procede a metilar estos sitios, reestableciendo tardíamente el patrón de metilación original. C) Cuando un sitio GATC se encuentra cercano o inmerso en una región reguladora, ciertas proteínas reguladoras pueden permanecer pegadas a estos sitios y evitar la metilación por DAM permanentemente, fijando el estado hemimetilado en la primera generación (panel C, tercera columna, hebras superiores). Esto llevaría a que se produzca un estado no metilado en la segunda generación (panel C, tercera columna, hebras inferiores). [52]

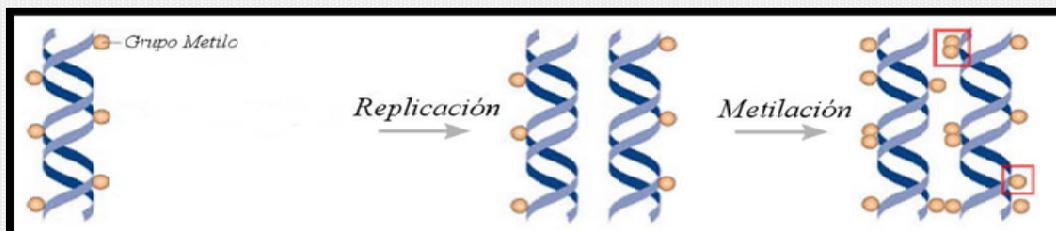
## Mecanismos de herencia epigenéticos

En sus inicios, el término epigenética fue utilizado para referirse al mecanismo encargado del proceso de diferenciación entre dos células idénticas, que conlleva a la formación de distintos tipos de tejidos u órganos en un sistema multicelular. En la actualidad la epigenética es la rama de la genómica encargada de estudiar todos aquellos cambios en los patrones de expresión genética de un organismo que son heredables, pero que no involucran cambios en la secuencia del ADN [52]. De esta forma, queda claro que un sistema epigenético necesita involucrar dos o más estados heredables de expresión genética. Aunque en un sentido más amplio, cualquier información sobre-impuesta a la secuencia del ADN de un organismo, puede ser considerada como “epigenética” según algunos grupos de investigación [52].

Entre los ejemplos más conocidos de sistemas epigenéticos podemos encontrar a los **priones** (la estructura de una proteína es transmitida a otras proteínas), la **impronta genómica** mejor conocida como *genomic imprinting* (en la que un alelo ya sea paterno o materno es silenciado permanentemente), la **modificación de histonas** (en la cual una región considerable de ADN puede quedar silenciada), y los **patrones de metilación del ADN** (los cuales se forman por la inhibición del proceso de metilación en ciertos sitios y producen cambios en la expresión genética del organismo). En todos estos casos, el estado del sistema se hereda (la estructura de una proteína, alelos silenciados, configuración de histonas, y patrones de metilación respectivamente) y salvo en el caso de los priones, dichas modificaciones provocan cambios en la expresión genética del organismo [52]. Estos cambios vistos desde una escala poblacional, tienen la posibilidad de generar variabilidad fenotípica sin la necesidad de generar cambios en la secuencia del ADN. Interesantemente, organismos poseedores de mecanismos regulados epigenéticamente son capaces de responder a cambios medioambientales de forma mucho más rápida, en comparación con su contraparte solamente regulada genéticamente [54].

En el caso de las bacterias ni la impronta genómica ni la modificación de histonas funcionan debido a que ambos mecanismos se basan en la presencia de histonas, las cuales no existen en bacterias. Los priones por otro lado, o al menos mecanismos muy similares a ellos, sí han sido reportados en estos organismos aunque todavía no queda clara cuál es su relevancia [52]. La metilación de ADN, por el contrario, está considerada como el mecanismo epigenético con mayor importancia en bacterias [52]. Éste consiste en modificar la secuencia de ADN mediante la adición o remoción de grupos metilo (-CH<sub>3</sub>) en determinados sitios. A las distintas configuraciones de presencia o ausencia de estos grupos en una secuencia de ADN determinada, se les llama **patrones de metilación**. Estos patrones se establecen y mantienen gracias a la actividad de unas proteínas conocidas como metiltransferasas (las cuales agregan grupos metilo) y estos patrones de metilación pueden variar entre célula y célula, entre tejidos o individuos, permitiendo así distintas expresiones genéticas aún en poblaciones isogénicas [53].

En *E. coli* así como en muchas otras bacterias Gram-Negativas, la metilación juega un papel muy importante en los procesos de replicación, segregación cromosomal entre células hijas, reparación del ADN y en la transposición de plásmidos [52] usando como señal principal el hecho de que la **replicación** del ADN es **semiconservativa** [55]. Esto significa que al generarse dos copias de una cadena doble de ADN completamente metilada, cada una de las copias se queda con una hebra antigua y otra recién sintetizada la cual carece de grupos metilo (ver imagen abajo). La nueva hebra, adquiere posteriormente sus respectivos grupos metilo usando como templado la cadena vieja, perpetuando así el patrón de metilación de la madre. No obstante, dichos patrones pueden variar entre las dos células resultantes por errores en el proceso de copiado o por obstrucción del proceso [52, 56].



### ***3.3. Crecimiento desacelerado.***

Otra de las diferencias fenotípicas importantes que presentan las poblaciones de bacterias resistentes con respecto a sus contrapartes silvestres, es el tiempo de división celular. Al examinar los tiempos de división entre las células resistentes y aquellas susceptibles, se detectó que creciendo en medios carentes de antibiótico, las células con mayor índice de resistencia se dividían hasta dos veces más lento que las células susceptibles <sup>[57]</sup>. Hasta el momento, una causa para esta observación no ha sido encontrada.

Una de las propuestas de este trabajo es que dicho crecimiento desacelerado se debe al menos en parte, a la presencia de las mismas bombas de eflujo que confieren resistencia. Dado que muchas de estas bombas son poco específicas en sus sustratos (en especial las de múltiples fármacos), se ha demostrado que éstas pueden además de expulsar una gran diversidad de sustancias tóxicas, expulsar metabolitos importantes para la célula <sup>[58]</sup>. Por lo tanto, el proceso de crecimiento y división celular podría verse afectado por la falta de distinción entre nutrientes y antibióticos.

### ***3.4. Asimilación genética***

Un aspecto interesante que reporta el grupo de Adam es que la baja estabilidad del fenotipo resistente desaparece conforme aumenta el tiempo que pasa la colonia en el proceso de selección. Es decir, que pese a que la reversibilidad del fenotipo resistente es alta en un inicio, tras varios procesos de selección la población empieza a mostrar tasas de reversibilidad cada vez más bajas, sugiriendo que las células han adquirido mutaciones más estables probablemente genéticas <sup>[30]</sup>.

Este proceso, comúnmente conocido como asimilación genética, se refiere al hecho de que caracteres originalmente producidos en respuesta a condiciones ambientales, son posteriormente codificados genéticamente, lo cual los hace significativamente menos variables y más estables <sup>[77]</sup>.

### 3.5. *El locus Mar como mediador del fenotipo resistente*

Dado que el locus *mar* es blanco del proceso de metilación por DAM<sup>[51]</sup>, dentro de una población distintos patrones de metilación podrían conllevar a expresiones genéticas distintas, generando variabilidad fenotípica relacionada directamente con el nivel de resistencia de las células. Estudios recientes adicionales a los de Adam y colaboradores demostraron que, dentro de una población isogénica tratada con antibiótico, existe una alta variabilidad en la producción de porinas y bombas de eflujo<sup>[59]</sup>. Además de que se ha demostrado que existe una alta correlación entre una mayor producción de bombas y un mayor índice de resistencia.<sup>[59]</sup>

Sabemos también que el locus *mar* es el encargado de regular la producción tanto de la bomba de eflujo AcrAB-TolC como de la porina OmpF<sup>[60]</sup>. Y como se mencionó antes, esta bomba es muy importante para el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos<sup>[61]</sup>. Dadas estas observaciones, resulta muy atractiva la idea de que distintos patrones de metilación en este locus son los responsables de la variabilidad en la producción de la bomba AcrAB-TolC, y que esta variabilidad es la causante de que unas células sobrevivan mientras que otras no ante la presencia de antibióticos.

A continuación presentaremos una breve descripción de la red de regulación de AcrAB-TolC (bomba) y de OmpF (porina encargada de regular la entrada de metabolitos y algunos antibióticos), mostrada en la Figura 3.4.

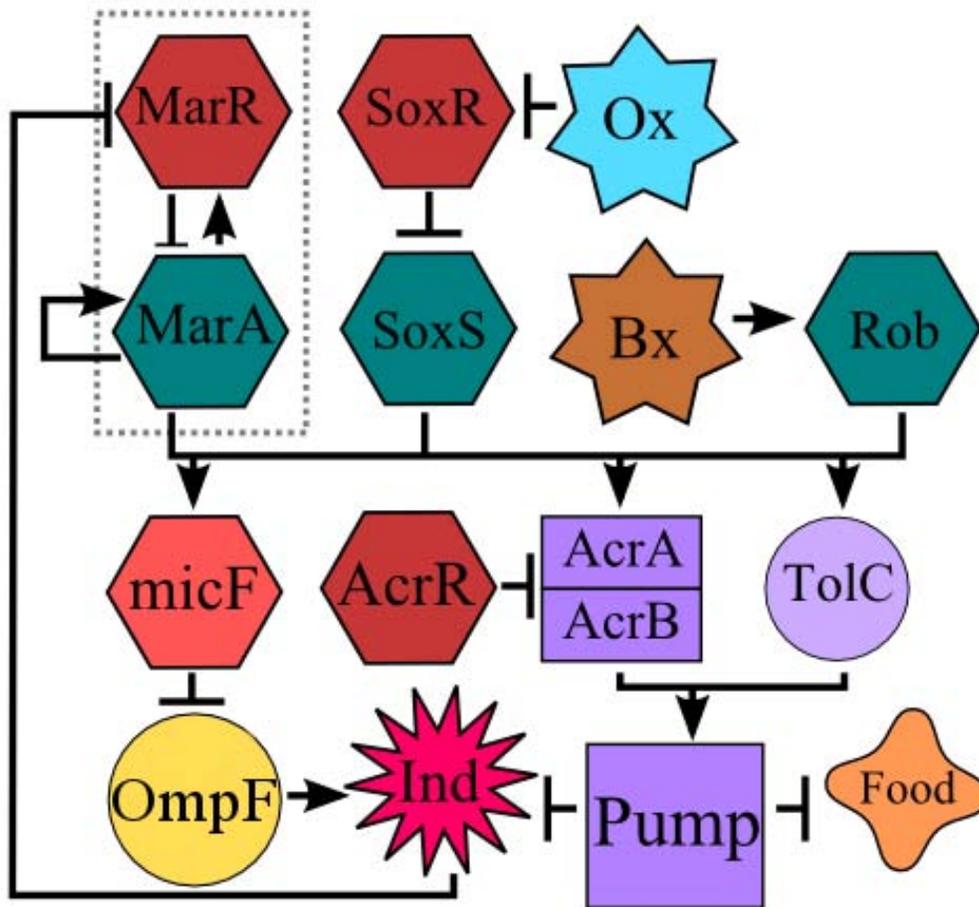


Figura 3.4 Red de regulación de la bomba AcrAB-TolC y de la porina OmpF. Las flechas indican una regulación positiva, mientras que las líneas en terminación obtusa indican una regulación negativa. El operón *mar* está indicado con una línea punteada. Refabricada <sup>[60]</sup>

Como se puede apreciar en la figura 3.5, el locus *mar* cuenta con dos unidades de transcripción divergentes (se transcriben en sentidos opuestos), que comparten una misma región reguladora u operadora, mejor conocida como *marO* <sup>[62]</sup>. La primera unidad transcripcional codifica para MarC quien se cree que funciona como una proteína transmembranal, aunque no hay evidencia experimental de esta función ni de qué papel específico tiene en la resistencia a fármacos <sup>[60]</sup>. La segunda unidad transcripcional codifica para tres proteínas: MarA que es un activador, MarR que es un represor y MarB de quien se desconoce su función. Dado que hasta el momento el papel que juega MarC y MarB en la aparición del fenotipo resistente es desconocido, de ahora en adelante nos referiremos como *operón mar* sólo a la segunda unidad transcripcional mencionada, sin contar a MarB. Es decir que sólo tomaremos en cuenta a MarA y a MarR como elementos relevantes y a *marO* como su región operadora.



externos, se encuentra principalmente reprimido <sup>[63]</sup>. Sin embargo, cuando MarR entra en contacto con cualquiera de los compuestos mencionados antes y pierde su función represora, los niveles basales de MarA hacen que la expresión del locus aumente considerablemente <sup>[25, 63]</sup>. Por esta razón, se utilizara para estos compuestos inhibidores de la función de MarR, el término antibiótico o inductor, indiscriminadamente.

Otros factores de transcripción aparte de MarA, tales como SoxS y Rob, al unirse a *marO* también pueden incrementar la transcripción del locus *mar* <sup>[25, 60]</sup>. Esto se debe a que las tres proteínas pueden unirse a un mismo tipo de secuencia, conocida comúnmente como *cajas-mar* y que está presente en *marO*. Interesantemente, las tres proteínas sólo requieren que estas secuencias mantengan un grado medio de identidad para unirse a ellas. Es decir que pese a que la secuencia encontrada no sea idéntica a una secuencia consenso (la cual se sabe reconocen con alta especificidad), estas proteínas pueden unirse a secuencias con cierto parecido y llevar a cabo su función reguladora <sup>[60]</sup>. Esto sugiere que la especificidad de unión para cada uno de los factores de transcripción depende directamente de qué variaciones están presentes en cada sitio de unión. Por lo mismo, la intensidad con la cual promueven la transcripción resulta distinta. Esto se debe en parte a que cada uno tiene una afinidad por el sitio y una capacidad reguladora distinta, pero además al hecho de que cada proteína responde a estímulos diferentes <sup>[25]</sup>. SoxS es regulado negativamente por SoxR, quien a su vez es inactivado por la presencia de estrés oxidativo (Ox Figura 3.4). Rob es activado por la presencia de sales biliares y ácidos grasos <sup>[67]</sup> (Bx Figura 3.4) mientras que MarA deja de ser reprimido por la presencia de compuestos fenólicos como el ácido salicílico y antibióticos tales como la tetraciclina y el cloranfenicol <sup>[25]</sup>. Estas diferencias hacen que el efecto de cada uno sea distinto y dependa de las condiciones ambientales. Como en este trabajo nos centraremos solamente en la respuesta a antibióticos, consideraremos la respuesta generada por MarA como la más importante y asumiremos que el papel de SoxS y Rob resulta despreciable ante antibióticos.

MarA pertenece a un conjunto de factores de transcripción representados por las proteínas AraC de *E. coli*, y XylS de *Pseudomonas putida*, conocidos como la familia AraC/XylS <sup>[25]</sup>. Este grupo ha sido asociado con múltiples funciones entre las cuales se encuentran: la regulación de la patogenicidad, metabolismo, fisiológicas y de respuesta a estrés. En el caso de la producción de bombas de eflujo, sabemos que la bomba AcrAB-TolC es regulada por MarA. La activación de la transcripción sucede cuando MarA se une a una *caja-mar* en la región promotora de los genes AcrA y AcrB <sup>[25, 60]</sup>. Un proceso similar

ocurre con la regulación del gen que codifica para el canal intermembranal TolC <sup>[60]</sup>. AcrR es otro factor de transcripción involucrado en la regulación de AcrAB. Ésta proteína es un regulador negativo débil y se ha demostrado que su presencia es principalmente para evitar la expresión estocástica de AcrAB <sup>[65]</sup>. Adicionalmente, MarA activa la transcripción de *micF*, un gen que codifica para un micro ARN capaz de inhibir la traducción del mensajero de la porina OmpF <sup>[25, 60]</sup>. De esta forma, MarA aumenta la extrusión de toxinas mediante un aumento en la producción de bombas y al mismo tiempo reduce la entrada de las mismas al bajar la concentración de porinas. En la Figura 3.4 se muestra que el complejo AcrA+AcrB+TolC forma una bomba funcional capaz de expulsar antibióticos (Inductor) así como metabolitos importantes para el crecimiento celular (Nutrientes).

El arreglo de los genes del locus *mar* esta conservado en 14 de 53 especies de Enterobacterias. Estas 14 especies pertenecen a los géneros putativamente patógenos de *Citrobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Enterobater*, *Kleibishella* y *Shigella*. De hecho, tanto la estructura del locus (sin *marB*) así como su funcionalidad, es extremadamente similar entre *E.coli* y *Salmonella entérica serotipo Typhimurium*, la cual es altamente dañina para humanos. La sobreexpresión de *marA* en *Enterobacter aerogenes* y *Mycobacterium smegmatis* mostró que el gen es funcional en ambas especies y que si estas son tratadas con salicilato se observa un claro aumento en la resistencia a varios agentes tóxicos <sup>[46]</sup>. Una búsqueda de homología usando la secuencia de *marA* como templado, muestra que existen homólogos en casi todas las especies de bacterias; aunque no se sabe de cierto si estos homólogos confieren resistencia.

Analizando los patrones de expresión de células carentes de DAM, se observó que la expresión de *marR* era significativamente menor (2.5 veces) en comparación con las células silvestres <sup>[66]</sup>. Dado que *marR* y *marA* comparten una misma unidad transcripcional, si suponemos que la tasa de transcripción de ambos esta correlacionada, esta observación podría explicar los bajos índices de resistencia observados experimentalmente en células carentes de DAM <sup>[51]</sup>. El hecho de que la ausencia de metilación conlleve a niveles bajos de expresión del operón *mar*, nos sugiere que en presencia de DAM distintos patrones de metilación podrían llevar a mayores expresiones del mismo. Por lo que en presencia de antibiótico la expresión de *marA* aumentaría considerablemente junto con las bombas de eflujo, generando así una mayor tolerancia a los antibióticos.

# 4

## Modelo unicelular de la resistencia adaptativa.

### 4.1. *Planteamiento*

Con el fin de entender las posibles causas detrás de la resistencia adaptativa, en este trabajo proponemos un modelo matemático-computacional para evaluar cuantitativamente qué elementos y procesos son los más relevantes para el surgimiento de dicha resistencia. La hipótesis central de este trabajo, la cual desarrollaremos detalladamente en éste y los siguientes capítulos, es que en una población isogénica existen distintos patrones de expresión genética relacionados con la producción de bombas de eflujo. Siendo estos patrones de expresión, generados y heredados a través de un mecanismo epigenético. De esta forma, tras la división celular, dichos patrones de expresión serán transmitidos de madres a hijas provocando correlaciones generacionales en el comportamiento de la red y por lo tanto en la resistencia a antibióticos. Para esto, iniciamos generando un modelo unicelular que pudiera reproducir la dinámica simple de la red de regulación de las bombas de flujo en presencia y en ausencia de antibiótico.

Nuestro modelo unicelular utiliza el formalismo de las ecuaciones diferenciales debido a que éste proporciona predicciones en un tiempo continuo y puede hacer uso de valores de parámetros obtenidos de datos experimentales. Estas propiedades hacen que sea relativamente sencillo comparar los resultados de estas simulaciones con los datos experimentales. Desafortunadamente en la mayoría de los casos prácticos, los valores preciosos de los parámetros no son conocidos y se vuelve necesario estimarlos.

Las ecuaciones diferenciales modelan la concentración de los elementos como variables dependientes del tiempo y de la concentración de otros elementos. A cada elemento se le asigna una función cuya forma y argumentos dependen de las interacciones o reacciones que se lleven a cabo en el sistema (en este caso, la red de regulación). Nuestro sistema modela la regulación genética de cada elemento con ecuaciones de tasas de cambio (*rate equations*), en las que se expresan los niveles de producción y degradación de los componentes como función de la concentración de los componentes que contribuyen a su producción o bien que interfieren con ella.

A continuación se presenta el sistema de ecuaciones diferenciales para una sub-red de la Figura 3.4 en el cual se omitieron los elementos Rob, SoxS y SoxR debido a que éstos no responden a antibióticos, sino a estrés oxidativo y otras señales.

$$\frac{dMarA}{dt} = \beta_0 \cdot \frac{MarA}{K_{Ma} + MarA} \cdot \frac{K_{Mr}}{K_{Mr} + MarR^*} \beta_1 \cdot \frac{MarA}{K_{Ma} + MarA} - \gamma_{Ma} MarA + \xi_{Ma}$$

$$\frac{dMarR}{dt} = \beta_0 \cdot \frac{MarA}{K_{Ma} + MarA} \cdot \frac{K_{Mr}}{K_{Mr} + MarR^*} - \gamma_{Mr} MarR + \xi_{Mr}$$

$$\frac{dAcrR}{dt} = \beta_{Ar} - \gamma_{Ar} AcrR + \xi_{Ar}$$

$$\frac{dAcrA}{dt} = \beta_{Aa} \cdot \frac{MarA}{K_{Ma} + MarA} \cdot \frac{K_{Ar}}{K_{Ar} + AcrR} - \gamma_{Aa} AcrA + \xi_{Aa}$$

$$\frac{dAcrB}{dt} = \beta_{Ab} \cdot \frac{MarA}{K_{Ma} + MarA} \cdot \frac{K_{Ar}}{K_{Ar} + AcrR} - \gamma_{Ab} AcrB + \xi_{Ab}$$

$$\frac{dTolC}{dt} = \beta_{Tc} \cdot \frac{MarA}{K_{Ma} + MarA} - \gamma_{Tc} TolC + \xi_{Tc}$$

$$\frac{dmicF}{dt} = \beta_{mf} \cdot \frac{MarA}{K_{Ma} + MarA} - \gamma_{mf} micF + \xi_{mf}$$

$$\frac{dOmpF}{dt} = \beta_{Of} - (K_{mf} \cdot OmpF \cdot micF) - \gamma_{Of} OmpF + \xi_{Of}$$

$$\frac{dI}{dt} = \iota_1 \cdot OmpF(I_{ext} - I) - (\varepsilon_I \cdot Pumps \cdot I) + \xi_I$$

$$\frac{dF}{dt} = \rho \cdot \frac{F_{ext} - F}{\theta_{diff} + (F_{ext} - F)} - \frac{\varepsilon_F \cdot Pumps \cdot F}{\theta_F + F} + \xi_F$$

$$\frac{dPumps}{dt} = \beta_p \cdot \left( \frac{AcrA^2 \cdot AcrB \cdot TolC}{\omega_p} \right)$$

$$MarR^* = \frac{MarR}{1 + \left( \frac{I}{K_I} \right)^2}$$

Este sistema de ecuaciones toma en cuenta la afinidad entre los factores de transcripción y el DNA, sus respectivas tasas de degradación, si el elemento se une a metabolitos o no así como la tasa de transcripción máxima, media y basal de los genes. No obstante, el valor preciso de la mayoría de estos parámetros se desconoce, por lo que fue necesario estimar o inferir la mayoría de ellos, buscando aquellos capaces de reproducir el comportamiento experimental del sistema (Ver Tabla 1 y Tabla 2). En capítulos posteriores mostraremos simulaciones en las cuales se aprecia qué tan sensible es el sistema a cambios en los valores de parámetros.

En estas ecuaciones,  $\beta_i$  representa la tasa de transcripción del elemento  $i$ , y  $\gamma_i$  representa su respectiva tasa de degradación.  $K_x$  representa las constantes de asociación entre el ADN y los distintos factores de transcripción ( $K_{Mr}$  y  $K_{Ma}$ ), o bien entre metabolitos y proteínas ( $K_I$ ).  $\xi$  ( $\xi_i$ ) es una variable gaussiana que representa el ruido presente en el proceso de transcripción. Los símbolos  $\iota$  (*iota*) y  $\rho$  (*rho*) representan las tasas de entrada de inductor (I) por medio de OmpF y de metabolitos esenciales (F) respectivamente.  $\varepsilon_I$  y  $\varepsilon_F$  representan las distintas tasas de extrusión de nutrientes (F) e inductor (I). El símbolo  $\omega$  (*omega*) representa la tasa de asociación entre los distintos componentes de las bombas de eflujo y las  $\Theta$ 's son constantes que modulan el proceso de entrada y salida de metabolitos esenciales por ósmosis o por flujo.

Con el fin de encontrar los elementos más importantes de la red, procedimos a buscar aquellos elementos sin los cuales la dinámica de la red, en presencia y ausencia de antibiótico, perdía el comportamiento observado experimentalmente. Todos aquellos elementos que pudieron ser sustituidos por un ajuste en el valor de los parámetros fueron eliminados, creando así una versión más compacta de la red de regulación (Figura 4.1).

Los nodos que fueron sustituidos para generar la versión reducida de la red fueron: AcrR, AcrA, AcrB, TolC y *micF*. A continuación describiremos las razones detrás de la eliminación de estos nodos.

Resultados experimentales han demostrado que el papel principal de AcrR es reprimir la expresión estocástica de AcrA y de AcrB. Sin embargo su papel resulta secundario en comparación con las vías regulatorias principales de éstos [68]. De hecho, más adelante veremos que en nuestras simulaciones su presencia puede ser sustituida mediante una reducción de la expresión basal de AcrA y AcrB, de tal forma que en ausencia del activador ninguno de los dos se exprese significativamente.

Pese a que la red de regulación de la bomba de eflujo AcrAB-TolC vía *mar*, es uno de los sistemas de bombas más conocido hasta el momento, para la gran mayoría de sus elementos se desconocen las constantes fisicoquímicas que gobiernan su comportamiento. En particular se desconocen las tasas de transcripción y traducción para *acrA/AcrA*, *acrB/AcrB* y *tolC/TolC*, así como la tasa de ensamblaje para la bomba tripartita AcrAB-TolC. Por ello, decidimos probar si asumiendo una relación lineal transcripción-traducción-ensamblaje podríamos seguir reproduciendo el comportamiento experimental en presencia y en ausencia de antibióticos. Esto con la finalidad de conjuntar estos elementos en un solo nodo representando a la bomba ya ensamblada. Dado que el hacer este cambio pudimos obtener un comportamiento similar al de la red completa (Ver Figura 4.2), decidimos adoptar para la red reducida esta nueva conformación.

Por último, debido a que *micF* funciona como un intermediario activado por *marA* y que regula negativamente la producción de la porina OmpF, probamos si su papel podía ser suplido mediante una regulación negativa directa entre el activador *marA* y *ompF*. Pese a que esta eliminación pudiera conllevar una pérdida en la robustez de la red en un contexto más general, en cuanto al comportamiento generado por la presencia y ausencia de antibióticos se refiere, su eliminación no requirió más que una sustitución en las ecuaciones

y un ajuste de parámetros, pudiendo mantener el mismo comportamiento observado que en la red completa (Ver Figura 4.2).

Vale la pena aclarar que esta nueva versión de la red de regulación, al haber perdido un número considerable de elementos ya no puede ser considerada como la red de regulación del operón *mar* y por lo mismo, el mantener los nombres específicos de los elementos podría resultar confuso. Por esta razón hemos decidido usar nombres mucho más generales y obvios para esta nueva red de regulación, tales como: activador, represor, bombas y porinas (Ver Figura 4.1).

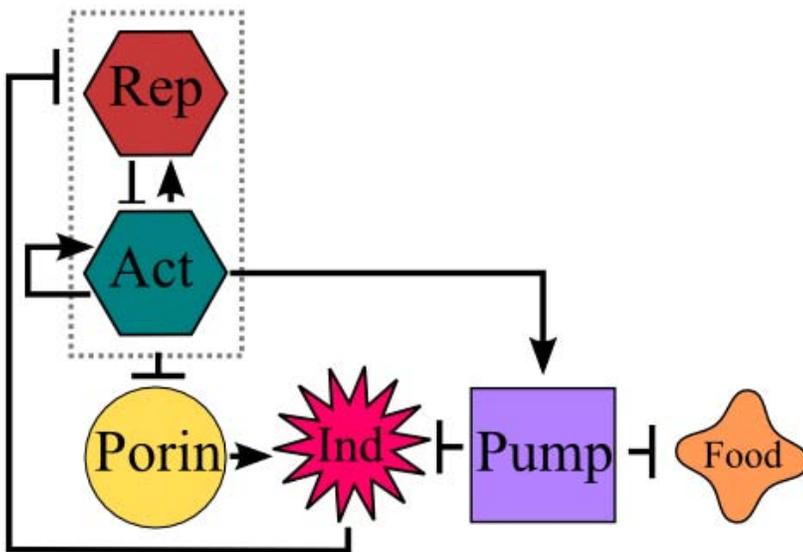


Figura 4.1 Red de regulación reducida para la producción de bombas y porinas. La red cuenta con dos reguladores principales: Un activador y un represor. En estado silvestre, el represor inhibe la producción del operón (Act y Rep encerrados en una línea punteada). Cuando el inductor (Ind) está presente, éste inhibe al represor, permitiendo que el Activador (Act) promueva la expresión del operón y de las bombas (Pump), al mismo tiempo que reduce la concentración de porinas (Porin). Las porinas son las encargadas de dejar entrar al antibiótico, mientras que las bombas se encargan de eliminar indiscriminadamente antibiótico y nutrientes (Food).

A continuación proponemos el sistema de ecuaciones correspondiente a la red reducida (Figura 4.1). En este caso, el significado de cada uno de los parámetros se encuentra en la Tabla 1 y el valor específico de las constantes utilizadas para las simulaciones se presenta en la Tabla 2. Es importante mencionar que el sistema presentado es adimensional. Esto significa que se removieron las unidades de los parámetros (tal como unidades de molaridad, velocidad de reacción, etc.) de tal forma que todos los parámetros quedaron redefinidos en base a la proporción que guardan con respecto a otros parámetros. Esto se debe a que mientras se mantengan las proporciones de los parámetros usados en nuestras simulaciones, se pueden obtener resultados cualitativamente similares a los obtenidos en este trabajo.

$$\frac{dA}{dt} = \beta_0 \cdot \frac{A}{K_A + A} \cdot \frac{K_{R^*}}{K_{R^*} + R^*} + \beta_1 \cdot \frac{A}{K_A + A} - \gamma_A A + \xi_A \quad (1)$$

$$\frac{dR}{dt} = \beta_0 \cdot \frac{A}{K_A + A} \cdot \frac{K_{R^*}}{K_{R^*} + R^*} - \gamma_R R + \xi_R \quad (2)$$

$$\frac{dQ}{dt} = \beta_Q \cdot \frac{K_A}{K_A + A} - \gamma_Q Q + \xi_Q \quad (3)$$

$$\frac{dP}{dt} = \beta_P \cdot \frac{A}{K_A + A} - \gamma_P P + \xi_P \quad (4)$$

$$\frac{dI}{dt} = \iota_I \cdot Q(I_{ext} - I) - (\varepsilon_I \cdot P \cdot I) + \xi_I \quad (5)$$

$$\frac{dF}{dt} = \rho \cdot \frac{F_{ext} - F}{\theta_{diff} + (F_{ext} - F)} - \varepsilon_F \cdot \frac{P \cdot F}{\theta_F + F} + \xi_F \quad (6)$$

$$R^* = \frac{R}{1 + \frac{I}{K_I}} \quad (7)$$

**Tabla 1. Significado de los parámetros del sistema de ecuaciones diferenciales**

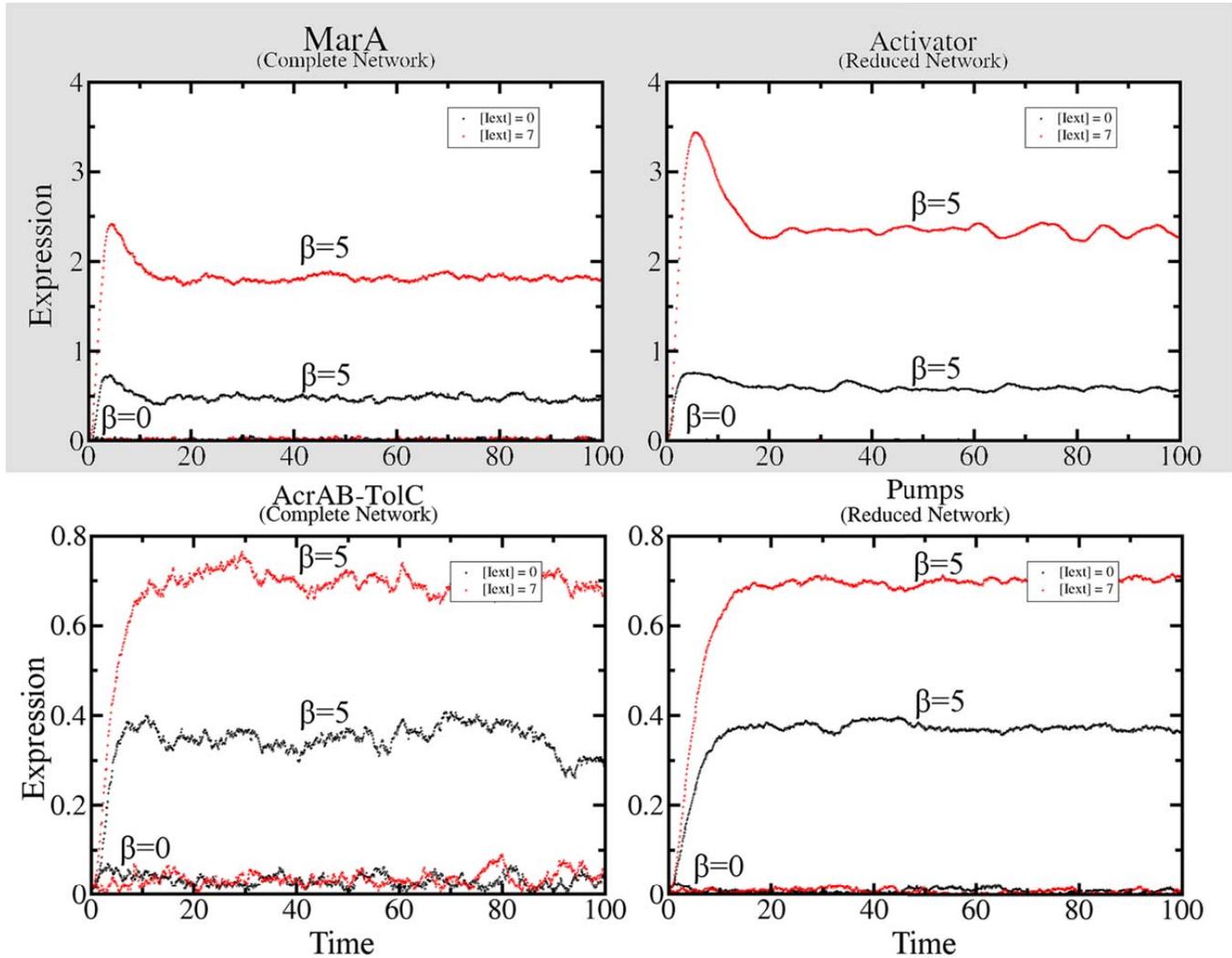
A	Concentración del Activador
R	Concentración total del Represor
R*	Concentración del Represor activo (no unido al inductor)
Q	Concentración de las Porinas
P	Concentración de las Bombas
I	Concentración interna del Inductor/Antibiótico
I <sub>ext</sub>	Concentración externa/ambiental del Inductor
F	Concentración interna de metabolitos esenciales (Nutrientes)
F <sub>ext</sub>	Concentración externa de metabolitos esenciales (Nutrientes)
K <sub>I</sub>	Constante de afinidad entre Represor-Inductor
K <sub>A</sub>	Constante de afinidad Activador-ADN
K <sub>R</sub>	Constante de afinidad Represor-ADN
β <sub>0</sub>	Tasa máxima de transcripción del operón Act+Rep
β <sub>x</sub>	Tasa máxima de transcripción del elemento X
γ <sub>x</sub>	Constante de degradación del elemento X
ρ	Tasa de entrada de metabolitos esenciales para la célula
ε <sub>F</sub>	Tasa de expulsión de metabolitos esenciales
ι <sub>I</sub>	Tasa de entrada de inductor a la célula
ε <sub>I</sub>	Tasa de expulsión de inductor por medio de bombas (Eficiencia de las Bombas)
ξ <sub>x</sub>	Ruido Gaussiano asociado al elemento X de la red
μ <sub>noise</sub>	Promedio de la distribución Gaussiana que determina el ruido ξ <sub>x</sub> para el elemento X de la red
σ <sub>noise</sub>	Varianza de la distribución Gaussiana que determina el ruido ξ <sub>x</sub> para el elemento X de la red

Parámetro	Valor
$\gamma_A$	0.5
$\gamma_R$	0.2
$\gamma_P$	0.2
$\gamma_Q$	1
$u$	1
$\epsilon_F$	0.25
$K_{R^*}$	0.25
$K_I$	0.05
$\theta_F$	6

Parámetro	Valor
$\sigma_\epsilon$	0.005
$\beta_P$	0.2
$\theta_I$	0.5
$\mu_{\text{noise}}$	0
$\mu_\beta$	0.5
$\mu_\epsilon$	0.5
$\Theta_{\text{diff}}, \Theta_{\text{int}}$	0.1
$\rho$	1
$K_A$	1
$\sigma_{\text{noise}}$	0.1
$\sigma_\beta$	0.1
$F_{\text{ext}}$	10
$\beta_Q$	0.1

**Tabla 2. Valores de los parámetros. Las relaciones usadas para seleccionar estos parámetros fueron: i) el hecho de que la afinidad de MarA con el DNA ( $K_A$ ) es cuatro veces mayor que la afinidad de MarR (activo) con el DNA ( $K_{R^*}$ ) [68, 69]. ii) Debido a que ha sido reportado que existe un proceso activo de degradación de MarA [70] seleccionamos una relación ( $\gamma_A > \gamma_R$ ). iii) Y dado que la estabilidad de las bombas ensambladas puede hacerlas durar más de un ciclo celular [71], se mantuvo la relación  $\gamma_Q > \gamma_P$ . El valor particular de los parámetros fue ajustado mediante las comparaciones presentadas en la Figura 4.4.**

En la Figura 4.2 mostramos que a pesar de tener un número menor de elementos, en comparación con la red completa, la red reducida presenta un comportamiento muy similar tanto en ausencia ( $I_{\text{ext}} = 0$ ) como en presencia de antibiótico ( $I_{\text{ext}} = 7$ ). La Figura 4.2 muestra a la par las simulaciones numéricas de la red completa (izquierda) así como las de la red reducida (derecha). En el panel superior (gris) se muestra la dinámica temporal de MarA y de su nodo correspondiente en la red reducida (activador). En el panel inferior (blanco) se muestra la dinámica de la bomba AcrAB-TolC y su correspondiente nodo, Bombas (Pumps), con y sin antibiótico (curvas rojas y negras). Se puede observar para ambas redes, que la presencia del antibiótico aumenta significativamente la expresión del activador y de las bombas. Puede observarse también que si la tasa máxima de expresión del activador (MarA o Activator) es cero (curvas con  $\beta_0 = 0$ ), pese a existir antibiótico en el medio, en ambos casos las bombas no aumentan su concentración y el activador mantiene una expresión basal apenas perceptible dada su cercanía con el eje horizontal.



**Figura 4.2** Comparación de la dinámica temporal de la red AcrAB-TolC y la red reducida. Expresión temporal del activador (Sección Gris) y de las bombas (Sección Blanca) para la red AcrAB-TolC (Paneles Izquierdos) y para la red reducida (Paneles Derechos). Cada curva representa la expresión del elemento en cuestión, con o sin antibiótico (Curvas rojas y negras) y con una tasa de expresión igual o distinta de cero ( $\beta = \{0,5\}$ ). Puede verse que ambas redes presentan un comportamiento cuantitativamente similar para todos los casos.

Dado que nos fue posible reproducir el comportamiento de la red completa, a partir de este punto trabajaremos solamente con la red reducida y usaremos nombres genéricos para los elementos de la red antes mencionados (tales como: *Activador*, *Represor*, etc) para referirnos a los elementos de la red. Usaremos el nombre de *Inductor* para referirnos a cualquier sustancia capaz de promover la expresión de esta red de regulación.

## 4.2. Validación del modelo

La validación de nuestro modelo se hizo comparando los resultados de nuestras simulaciones con datos experimentales reportados en la literatura. El primer comportamiento que buscamos reproducir fue el cambio en la expresión genética cuando el antibiótico es introducido. Se ha reportado en un gran número de artículos que la expresión de *marA*, y por lo tanto de las bombas de eflujo, aumentan significativamente tras el contacto con algunos antibióticos [25, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 62]. Por ello decidimos hacer la comparación de la expresión de la red en presencia y en ausencia de antibiótico (Ver Figura 4.3). Puede observarse que la expresión del Activador, del Represor y de las Bombas aumentan, mientras que la producción de porinas, así como el estado activo del represor ( $R^*$ ), bajan considerablemente.

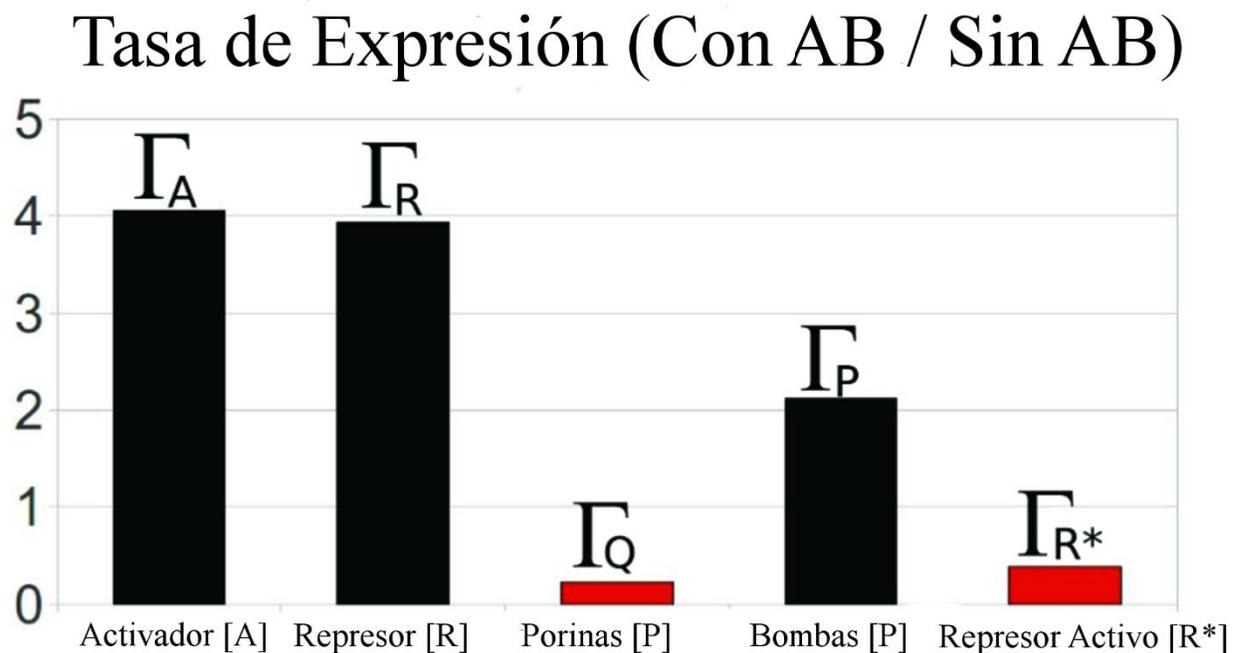
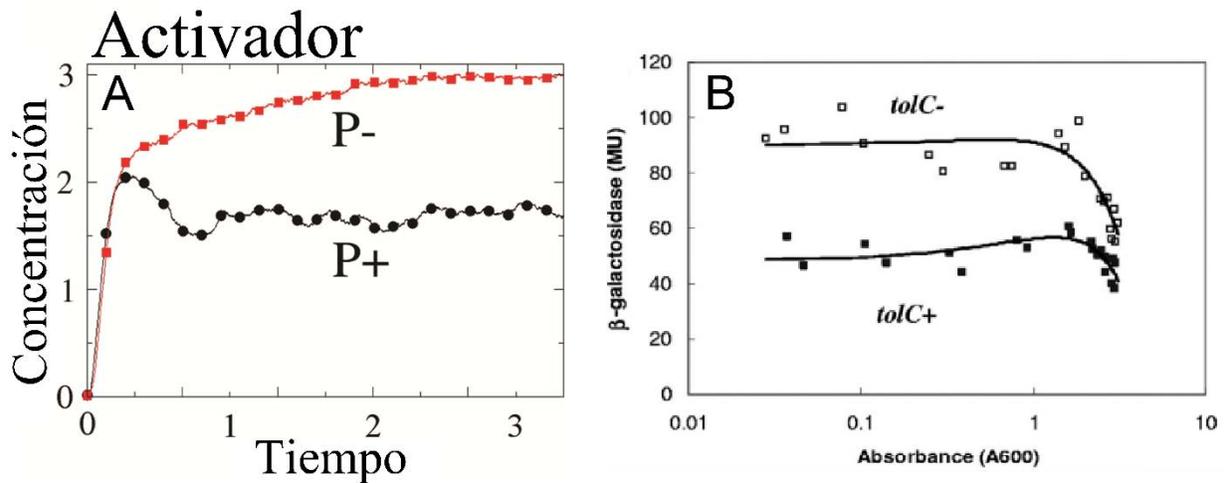


Figura 4.3 Se muestra la expresión de la red reducida para varios elementos de la red, como una tasa entre la expresión con antibiótico y la expresión sin antibiótico,  $\Gamma_x = X_a/X_w$ . Todos aquellos elementos con un valor de  $\Gamma > 1$  (barras negras) son los que tienen una mayor expresión en presencia de antibiótico, mientras que aquellos con  $\Gamma < 1$  (barras rojas) tienen una expresión menor. Este es exactamente el comportamiento esperado para una cepa silvestre.

Además de modelar el comportamiento silvestre, decidimos comparar nuestras simulaciones con la dinámica reportada en cepas mutantes. Fuera del comportamiento trivial del mutante de MarR, en dónde la expresión del activador aumenta <sup>[72, 73]</sup>, el único mutante para el cual se han reportado curvas de expresión del activador, es la cepa mutante  $\Delta$ TolC <sup>[73]</sup>. Nuestra simulación correspondiente a esta mutante se realizó fijando la concentración de las bombas en cero a lo largo de la simulación. Como puede verse en la Figura 4.4, con la red reducida es posible obtener un comportamiento cualitativamente similar al observado experimentalmente, en donde la ausencia de TolC provoca que la expresión de MarA sea aproximadamente dos veces más alta que en la cepa silvestre. Es importante mencionar que los datos experimentales fueron obtenidos de cultivos celulares mientras que los de nuestra simulación reflejan el comportamiento de una sola célula. Por lo mismo, las gráficas no se han puesto a la par con el fin de hacer una comparación cuantitativa entre ellas, sino cualitativa, resaltando el hecho de que en ambos casos el comportamiento del activador aumenta considerablemente (2 veces aproximadamente) en ausencia de bombas funcionales.

En la figura 4.4-B puede observarse también que a lo largo de las mediciones existe cierta variabilidad. Pero pese a que estas oscilaciones se mantienen relativamente constantes a lo largo del experimento, resulta claro que en los últimos puntos (4.4-B extrema derecha) la expresión de *marA* decae drásticamente sin importar la presencia o ausencia de TolC <sup>[72]</sup>. Las razones de este decaimiento final no han sido aclaradas hasta el momento, más este cambio en la expresión de *marA* puede tener importantes implicaciones en los niveles de resistencia de estas células.

Una posible explicación de esta reducción en la expresión de *marA*, podría ser un cambio en la fase de crecimiento del cultivo celular (ej. fase exponencial  $\rightarrow$  fase estacionaria). Ha sido reportado que una de las implicaciones de entrar a la fase estacionaria, es una pérdida considerable en la permeabilidad de la membrana celular de las bacterias <sup>[75]</sup>. Entonces, en dicha fase, debido a una ausencia de nutrientes y a un excedente de subproductos metabólicos dañinos para la célula, la pared celular sufre cambios significativos que protegen a la célula y reducen la entrada de metabolitos <sup>[76]</sup>. Este sellamiento implicaría también una reducción en la entrada de antibióticos, lo cual tendría como primera consecuencia el regreso al estado activo de marR, el cual a su vez provocaría la observada reducción en la expresión de *marA* y por ende de las bombas de eflujo.



**Figura 4.4 Validación y calibración del modelo unicelular. A) Simulación numérica. Se muestra la dinámica temporal del activador en una red carente de bombas (P-, Rojo) y en otra silvestre (P+, Negro). B) Datos experimentales <sup>[72]</sup> en los cuales se mide la expresión de MarA en una cepa carente del canal TolC (tolC-) y en una cepa silvestre (tolC+). Puede verse que ambas gráficas muestran que en ausencia de bombas funcionales, la expresión de MarA es aproximadamente dos veces mayor que en la cepa silvestre.**

Es importante mencionar que debido a que desconocemos la gran mayoría de los valores reales de los parámetros, el espacio de búsqueda para encontrar aquellos funcionales es gigantesco. En este trabajo no es nuestra intención proporcionar las regiones completas de valores bajo las cuales nuestros resultados se mantienen, sino presentar un conjunto de parámetros biológicamente plausibles bajo los cuales el comportamiento del modelo unicelular es similar al observado experimentalmente, para así posteriormente incrementar el alcance del modelo y simular poblaciones de bacterias sometidas a incrementos graduales en la concentración de antibiótico. En la sección de 5.6 (*Otros Experimentos*) presentamos simulaciones en las cuales se usaron distintos conjuntos de parámetros, con la finalidad de que el lector vea que los parámetros presentados en la Tabla 2 no fueron finamente ajustados, sino que los resultados de nuestro trabajo se mantienen bajo otros espectros de valores.

Como veremos a continuación, no todos los parámetros afectan la dinámica del sistema de la misma manera. Mientras que algunos de ellos pueden variar en un rango amplio de valores sin afectar significativamente el comportamiento del sistema, otros tales como  $\beta_0$  y  $\epsilon_1$  resultan fundamentales para determinar los niveles de resistencia de la célula y por lo tanto juegan un papel determinante en la emergencia de la resistencia adaptativa.

### 4.3. *División celular: Bombas V.S. Nutrientes*

Se ha observado que la resistencia a antibióticos esta correlacionada con tasas de división celular más lentas [57]. En nuestras simulaciones, hemos modelado la velocidad de la división celular como una variable dependiente de la cantidad de nutrientes ( $F$ ) que la célula acumula en el tiempo. Es decir, que dada una concentración de estos nutrientes, la célula los va a ir acumulando a lo largo de un periodo de tiempo hasta un umbral ( $\Theta_F$ ) el cual una vez alcanzado, le indica que es momento de proceder con la división celular. Una vez llevada a cabo la división celular, la carga de nutrientes es consumida por completo ( $F = 0$ ) y las células hijas necesitarán volver a acumular nutrientes para poder dividirse. En la Figura 4.5 se muestra el tiempo aproximado que tarda una célula en alcanzar el umbral  $\Theta_F$  y llevar a cabo la división celular. Esta medición es presentada para células con distintos valores de  $\beta_0$  así como para tres diferentes concentraciones de antibiótico. Puede observarse claramente que el tiempo de división celular aumenta con respecto a la concentración de antibiótico y a  $\beta_0$ . Este fenómeno se debe a que incrementos en  $\beta_0$  provocan un aumento de la concentración de bombas (aún en ausencia de antibiótico); y a que la presencia del antibiótico induce un aumento en la transcripción del activador quien a su vez también aumenta la concentración de bombas. Dado que la concentración de nutrientes o metabolitos esenciales depende inversamente de la concentración de bombas, ambos escenarios provocan una división celular más lenta. Estos resultados muestran que un costo asociado a la producción de bombas basta para explicar la diferencia en tiempos de división celular entre bacterias resistentes y no resistentes.

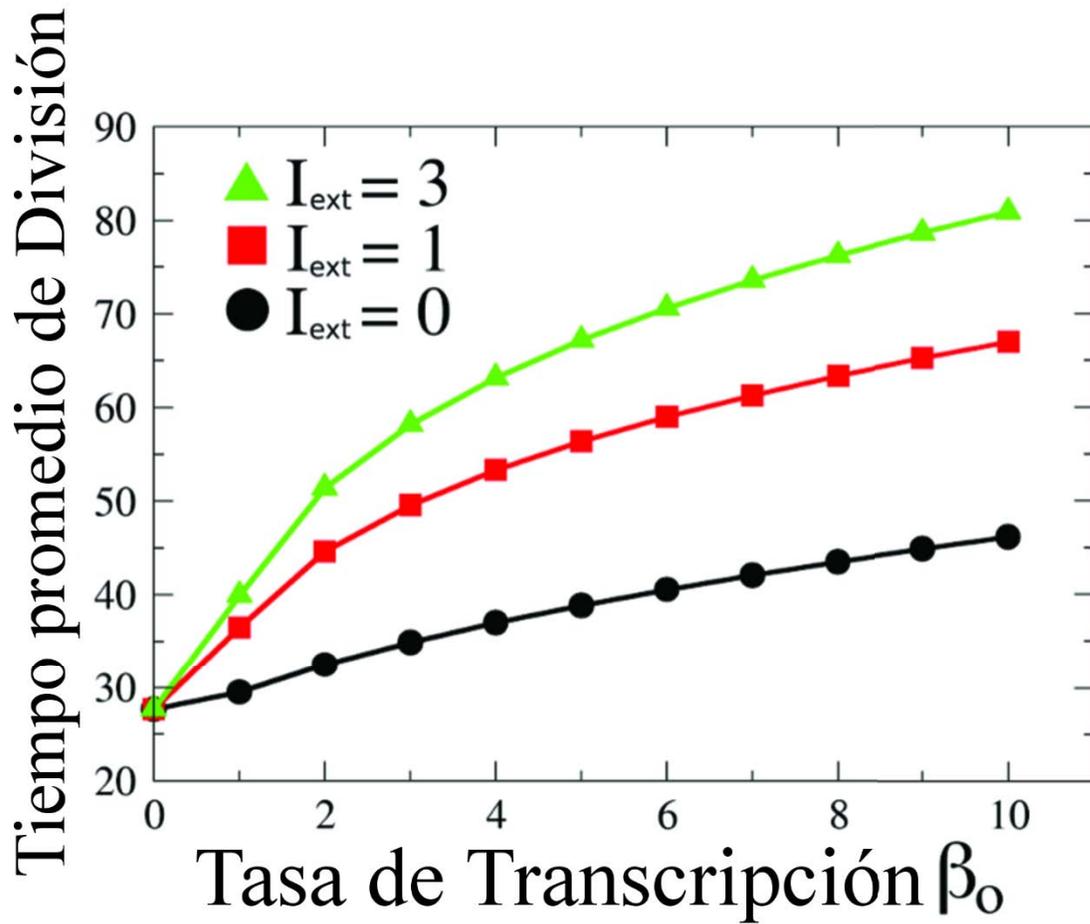


Figura 4.5 Tiempo de división celular mediada por el costo de producción de bombas de eflujo. Cada punto en la curva representa el tiempo de división celular (eje vertical) dada una concentración de antibiótico (triángulos, cuadrados y círculos) y un valor fijo de  $\beta_0$  (eje horizontal).

# 5

## Modelo Poblacional

### 5.1. *Variabilidad, herencia, crecimiento y muerte*

Basados en el modelo unicelular presentado en el capítulo cuatro, construiremos un modelo poblacional en el cual cada célula será representada por una copia independiente del sistema de ecuaciones de la red de resistencia reducida. Cada una de estas células al alcanzar el umbral de nutrientes (ver sección 4.3) procederá a dividirse y dos células hijas tomarán su lugar en la población, aumentando el número de células en la simulación. Otro proceso importante que fue incluido para estas simulaciones, es la muerte celular causada por el antibiótico. En nuestro modelo, para que una célula sobreviva a lo largo de la simulación, debe ser capaz de mantener en todo momento la concentración de antibiótico por debajo de un umbral determinado ( $\Theta_I$ ). Si este umbral en algún punto es alcanzado, la célula muere y es eliminada de la población.

En el modelo poblacional, la variabilidad entre células está dada a través de cambios en dos de los parámetros de las ecuaciones. El primero es la eficiencia de las bombas ( $\epsilon_I$ ), en donde altos valores de este parámetro significan que la bacteria posee bombas que operan con gran rapidez o con mayor especificidad para deshacerse del antibiótico. Dado que un cambio en la eficiencia de las bombas probablemente implica un cambio estructural de las mismas, asumiremos que los cambios en este parámetro serán causados por mutaciones genéticas. Por otro lado, hemos mencionado que existe una variabilidad en la población no necesariamente genética <sup>[51]</sup>. Y que ésta, probablemente tenga su origen en mecanismos epigenéticos que alteran la expresión del sistema de producción de bombas. Por esta razón, el segundo parámetro involucrado en la variabilidad entre células, y que se verá afectado a lo largo de nuestras simulaciones es la tasa de transcripción del operón mar

( $\beta_0$ ). Como se mencionó en la sección 3.2, las modificaciones en las tasas de transcripción probablemente se deban a cambios en los patrones de metilación del ADN, los cuales pueden modificar la afinidad de los factores de transcripción involucrados [52].

Dado que un candidato muy atractivo para llevar a cabo este proceso de metilación es la proteína DAM (ver sección 3.2), hicimos una búsqueda de sus secuencias blanco (*GATC*) en la región reguladora del operón *mar* en *E. coli* y encontramos 12 de ellas. Dado que cada uno de estos sitios puede estar metilado o no metilado, podemos asumir que existen  $2^{12} = 4086$  posibles patrones de metilación en esta región reguladora. Suponiendo que cada patrón conlleva a una tasa de transcripción distinta, este número es suficientemente grande para modelar los cambios en el parámetro  $\beta_0$  de forma continua. De esta forma, células con valores altos de  $\beta_0$  producirán bombas en grandes cantidades (y viceversa), lo cual afectará su capacidad de resistir la presencia de antibióticos. La variabilidad en estos dos parámetros se simulará seleccionando para cada célula un valor para  $\beta_0$  y otro para  $\epsilon_I$ , a partir de las distribuciones Gaussianas  $G(\mu_\beta, \sigma_\beta)$  y  $G(\mu_\epsilon, \sigma_\epsilon)$  respectivamente, en donde  $\mu$  representa el promedio y  $\sigma$  la varianza de cada parámetro. La herencia, ya sea genética o epigenética, será simulada al introducir correlaciones entre la Gaussiana de la cual la célula madre selecciona sus parámetros y las Gaussianas de las cuales las hijas seleccionan los suyos. Este proceso se ilustra en la Figura 5.1 y se detalla a continuación.

Supongamos que tenemos una célula  $i_0$  en la generación  $t$  quien posee una tasa de transcripción  $\beta_0(i, t)$ . Al dividirse, la siguiente generación ( $t+1$ ) contará con dos células:  $i_1$  e  $i_2$ . Cada una de ellas seleccionará un valor para  $\beta_0$  respectivamente:  $\beta_0(i_1, t+1)$  y  $\beta_0(i_2, t+1)$ . Estos valores se obtendrán de una Gaussiana  $G(\beta_0(i, t), \sigma_\beta)$ , cuyo promedio estará determinado por el valor  $\beta_0(i, t)$  previamente asignado para la madre. En otras palabras, en cada duplicación celular y para cada célula resultante, el valor de  $\beta_0$  se obtendrá de distribuciones Gaussianas con un promedio igual al valor de  $\beta_0$  previamente asignado a la madre. Este mecanismo claramente correlacionará el parámetro  $\beta_0$  a lo largo de las divisiones celulares, lo cual pretende simular el proceso en el cual los patrones de metilación se heredan de madres a hijas, con cierta probabilidad de variación.

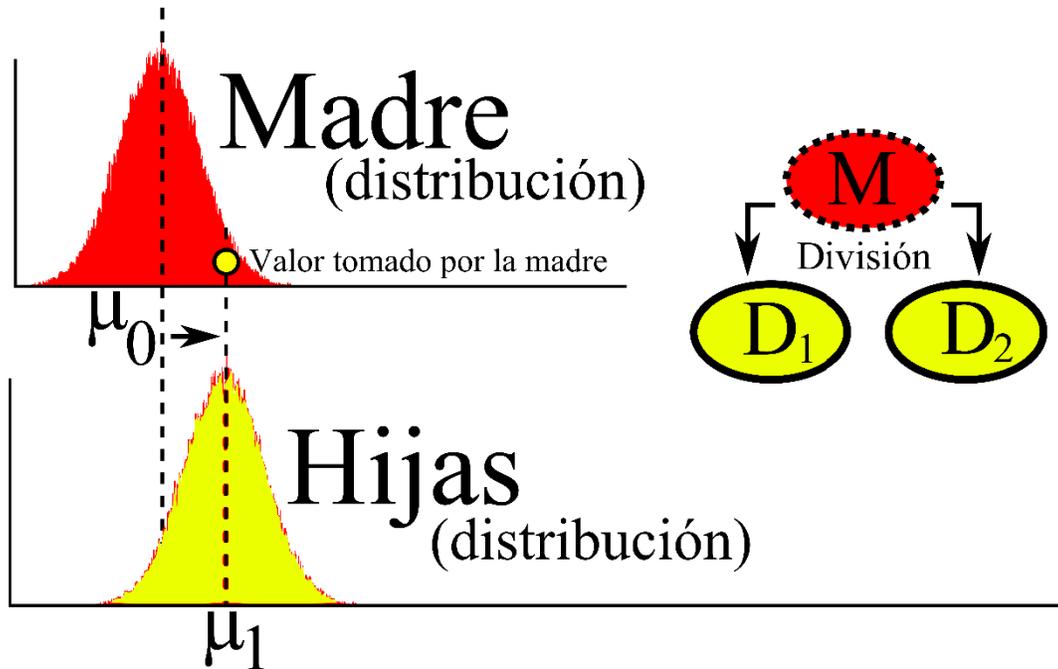


Figura 5.1. Mecanismo de Herencia genética y epigenética. La distribución inicial de la Madre se muestra en Rojo. El punto amarillo dentro de la distribución representa el valor específico adquirido por la madre (en este caso =  $\mu_1$ ). La distribución de las hijas de la célula madre después de la división está representada en amarillo. Las elipses del panel derecho representan el proceso de división en donde una célula madre (M) se divide y da origen a dos células (D1 y D2) quienes tomaran valores de una distribución (Amarilla) ahora centrada en el valor obtenido por la madre ( $\mu_1$ ). La diferencia entre la herencia genética y epigenética está dada por el valor que tiene la desviación estándar en la distribución para  $\beta_0$  y  $\epsilon_1$ . Nótese que la distribución amarilla puede estar, con respecto a la roja, recorrida a la izquierda o derecha dependiendo del valor tomado por la célula madre.

Para simular la herencia genética presente en la eficiencia de las bombas,  $\epsilon_1$ , se utilizó un proceso muy similar al implementado para  $\beta_0$ . La diferencia es que ahora se utilizó la respectiva distribución Gaussiana  $G(\mu_\epsilon, \sigma_\epsilon)$ . Otra diferencia importante entre estos dos procesos es que los cambios en  $\epsilon_1$  serán asumidos como genéticos, mientras que los cambios en  $\beta_0$  son asumidos como epigenéticos. Esto tiene como consecuencia que las escalas de tiempo a las cuales estos dos procesos suceden, difieren significativamente <sup>[54]</sup>. Ha sido reportado que los cambios fenotípicos dados por modificaciones epigenéticas, suceden al menos un orden de magnitud más rápido que aquellos debidos a cambios genéticos <sup>[54]</sup>. Por esta razón, hemos definido distintos valores para la varianza de cada una de las distribuciones;  $\sigma_\beta = 0.1$  y  $\sigma_\epsilon = 0.005$  (Ver tabla 1) de tal forma que  $\sigma_\beta$  es 20 veces mayor que  $\sigma_\epsilon$  ( $\sigma_\beta = 20\sigma_\epsilon$ ). Entre las implicaciones que tiene el usar estas varianzas tan pequeñas, es que los cambios en la expresión genética así como en la eficiencia de las bombas se darán de forma gradual. Hasta el momento no existen datos experimentales que prueben si

un mecanismo de cambios graduales en estos parámetros sea la forma en la que sucede en las bacterias reales. Pero si este mecanismo es sustituido por uno en el cual cambios abruptos en los valores de los parámetros son permitidos (Usando, por ejemplo, una distribución uniforme en lugar de una Gaussiana) la población no es capaz de sobrevivir los incrementos sucesivos en la concentración de antibiótico (Ver sección 5.6).

## 5.2. *Cuatro posibles escenarios*

Con el fin de determinar el efecto que cada tipo de herencia (genética o epigenética) tiene sobre el surgimiento de la resistencia adaptativa, se propusieron los siguientes cuatro escenarios de herencia:

1.- **Caso Control:** En este caso no se implementó ningún tipo de herencia. Es decir, que no existen correlaciones entre los parámetros de células madre y células hijas; solamente hay variabilidad. Las distribuciones Gaussianas  $G(\mu_\beta, \sigma_\beta)$  y  $G(\mu_\varepsilon, \sigma_\varepsilon)$  permanecerán exactamente iguales para todas las células y a lo largo de toda la simulación.

2.- **Herencia Genética:** En este escenario se implementan correlaciones en las distribuciones Gaussianas que determinan la eficiencia de las bombas  $\varepsilon_I$  pero no en aquellas que determinan la tasa de transcripción  $\beta_0$ .

3.- **Herencia Epigenética:** Este escenario es contrario al anterior, pues se implementan correlaciones en las distribuciones Gaussianas que determinan la tasa de transcripción  $\beta_0$  pero no en las que determinan la eficiencia de las bombas  $\varepsilon_I$ .

4.- **Herencia Mixta:** Este es el escenario más completo, pues se implementan correlaciones en las Gaussianas que determinan ambos parámetros  $\beta_0$  y  $\varepsilon_I$ .

Es importante mencionar que un escenario en donde la tasa de transcripción  $\beta_0$  sea modificada por cambios genéticos es completamente posible. En nuestro modelo, para fines prácticos, hemos decidido asignarle un nombre a los dos tipos de herencia y variabilidad (rápida  $\rightarrow$  epigenética / lenta  $\rightarrow$  genética) fundamentados en observaciones experimentales [51, 54]. Sin embargo, el hecho de que la tasa de transcripción varíe entre células no implica que dicha variación provenga de cambios forzosamente epigenéticos, más solamente que tenga un mayor índice de variabilidad que los cambios genéticos y que sea heredable de células madres a hijas. De hecho, dada la forma en cómo hemos decidido

modelar ambos tipos de herencia ( $\sigma_\beta \gg \sigma_\epsilon$ ), el permitir cambios genéticos en  $\beta_0$  (tal como lo hemos modelado para la eficiencia de las bombas) tiene como consecuencia un aumento en  $\sigma_\beta$  del orden de  $\sigma_\epsilon$ , el cual en proporción con el valor de  $\sigma_\beta$  es despreciable ( $\sigma_\beta = 20\sigma_\epsilon$ ) y los mismos resultados que los presentados a continuación son observados.

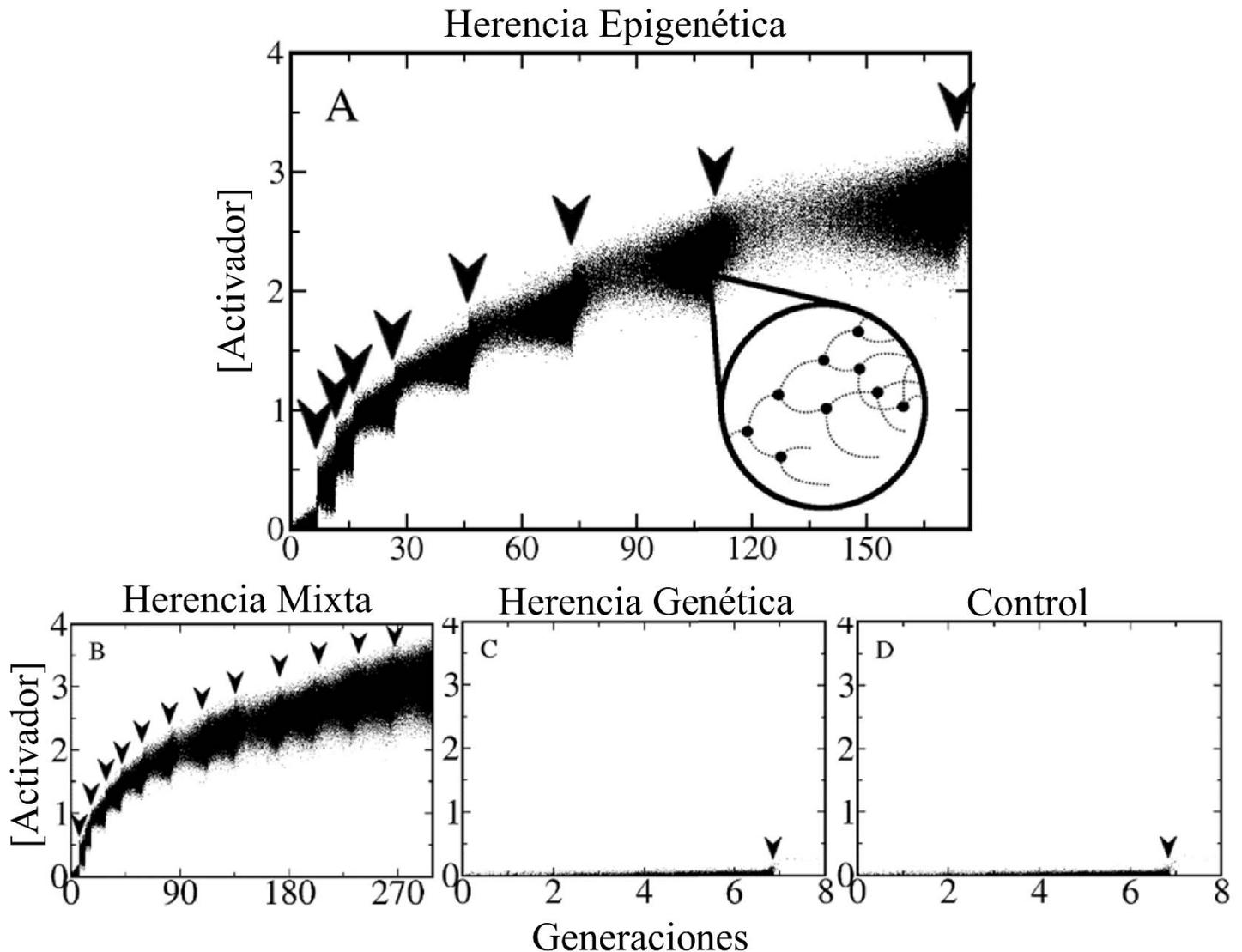
### 5.3. Resistencia Adaptativa

Para simular los experimentos en los cuales se observó el fenómeno de resistencia adaptativa en una población de bacterias, sometimos a nuestra población de células simuladas a un proceso en el cual la concentración de antibiótico en el medio es aumentada en una cantidad determinada  $\Delta I_n$ . De esta forma, tras  $M$  inducciones o *shocks*, la concentración final de antibiótico externa será igual a  $I_{\text{ext}} = \sum_{n=1}^M \Delta I_n$ .

En la Figura 5.2 se presenta para cada uno de los escenarios mencionados anteriormente, la expresión del Activador de cada una de las células de la población a lo largo de la sucesión de incrementos de antibiótico. Dado que se usarán en repetidas ocasiones este tipo de gráficas, de ahora en adelante nos referiremos a ellas como “*gráficas de seguimiento*”. En este caso, cada shock está representado con una flecha vertical negra. Puede verse claramente que justo después de cada aumento, la población se reduce considerablemente pues muchas células mueren y desaparecen de la población. De hecho, son estas muertes las que le dan a la gráfica su apariencia escalonada. Las pocas células que sobreviven son dejadas en esta nueva concentración hasta que, tras varias divisiones celulares, la población alcanza un tamaño de  $N = 5000$  células. Una vez alcanzado este número, la población es sometida a un nuevo shock. Puede observarse que únicamente en los escenarios en donde la herencia epigenética está presente (Paneles A y B), la población es capaz de crecer y aumentar significativamente su resistencia, mientras que por el contrario en el caso control, en donde no existe la herencia y sólo funciona la variabilidad, o en el caso de la herencia genética, la población muere por completo tras el primer shock de antibiótico. Esto nos muestra que ni la variabilidad ni la herencia genética son suficientes para lograr el surgimiento de la resistencia adaptativa.

A pesar de que la herencia genética no es capaz de producir poblaciones resistentes, resulta interesante notar que cuando se implementan al mismo tiempo la herencia genética y la epigenética (Panel B), la población es capaz de resistir un mayor número de shocks en el mismo intervalo de tiempo que cuando sólo está presente la herencia epigenética (12

V.S. 8 shocks). Otra observación interesante es el hecho de que el tiempo que tarda la población en alcanzar el tamaño de  $N = 5000$  células, va aumentando conforme la población se va volviendo más y más resistente. Esto puede verse por la separación entre las flechas horizontales que indican cada uno de los shocks de antibiótico, y concuerda muy bien con las observaciones experimentales mencionadas en la sección 4.3.



**Figura 5.2** Emergencia de la Resistencia adaptativa. Para cada célula la concentración del activador es representada a intervalos constantes por medio de puntos. Las flechas indican cada uno de los shocks de antibiótico. (A) Herencia Epigenética (B) Herencia Mixta (C) Herencia Genética (D) Caso Control. La gráfica interna del panel A, es una representación de la gráfica de seguimiento en donde la expresión de un solo un linaje celular es reportada a lo largo de divisiones y muertes celulares. Cada generación (eje horizontal) corresponde al tiempo que tarda en dividirse una célula con  $\beta = 1$  en ausencia de antibiótico (Ver Figura 4.5).

A pesar de que los incrementos en la concentración de antibiótico pueden ser variables, es importante mencionar que si este aumento se hace de forma desmesurada (ej: duplicando la concentración anterior o más) o bien, no se le permite a la población crecer lo suficiente (menos de 10 generaciones entre cada shock), sin importar el tipo de herencia que este en juego, ninguna población logra sobrevivir por más de un par de shock de antibiótico resultando en una gráfica de seguimiento idéntica a los paneles C o D de la figura 5.2.

## 5.4. *Reversibilidad*

Hasta ahora se ha mencionado que las diferencias entre la herencia genética y la herencia epigenética se basan simplemente en las escalas de tiempo en las cuales suceden los cambios fenotípicos relevantes en la población ( $\sigma_\beta = 20\sigma_\varepsilon$ ) así como en los parámetros que afectan cada una ( $\beta_0$  v.s.  $\varepsilon_1$ ). No obstante, sabemos que a diferencia de los cambios epigenéticos, las mutaciones genéticas son raramente reversibles <sup>[54]</sup>. Además, una de las características principales que separa a la resistencia adaptativa de otros tipos de resistencias, es su baja estabilidad. Como se mencionó antes, se sabe por resultados experimentales, que al eliminar el antibiótico del medio la población resistente pierde su fenotipo tras un determinado tiempo, regresando a su estado silvestre de susceptibilidad <sup>[44, 51]</sup>. Es por esta razón que quisimos probar si nuestro modelo poblacional era capaz de reproducir estas observaciones.

Para probar esto replicamos, con el escenario de Herencia Mixta, el experimento anterior en donde se incrementó gradualmente la concentración de antibiótico pero en esta ocasión una vez que la población alcanzó un alto nivel de resistencia (12 ~ 13 shocks), se quitó el antibiótico del medio ( $I_{ext} = 0$ ) y se dejó crecer a la población por varias generaciones. En la figura 5.3 se muestran los resultados de esta simulación. En este caso, la flecha negra en la gráfica de seguimiento del Panel A indica el momento en el cual el antibiótico fue removido del medio. Puede verse que justo después de esta flecha, la concentración del activador decae abruptamente, llegando eventualmente a una tasa de expresión muy baja. En el Panel B de esta misma figura, se muestra cómo cambia el tamaño de la población como función del tiempo y de las distintas concentraciones de antibiótico. En este mismo panel puede verse cómo la población decae exponencialmente tras cada shock de antibiótico, y como después de un determinado tiempo, ésta poco a poco empieza a crecer nuevamente hasta recuperar su tamaño de  $N = 5000$  células. Nótese cómo conforme la población se vuelve más resistente, las curvas de recuperación tienen una caída

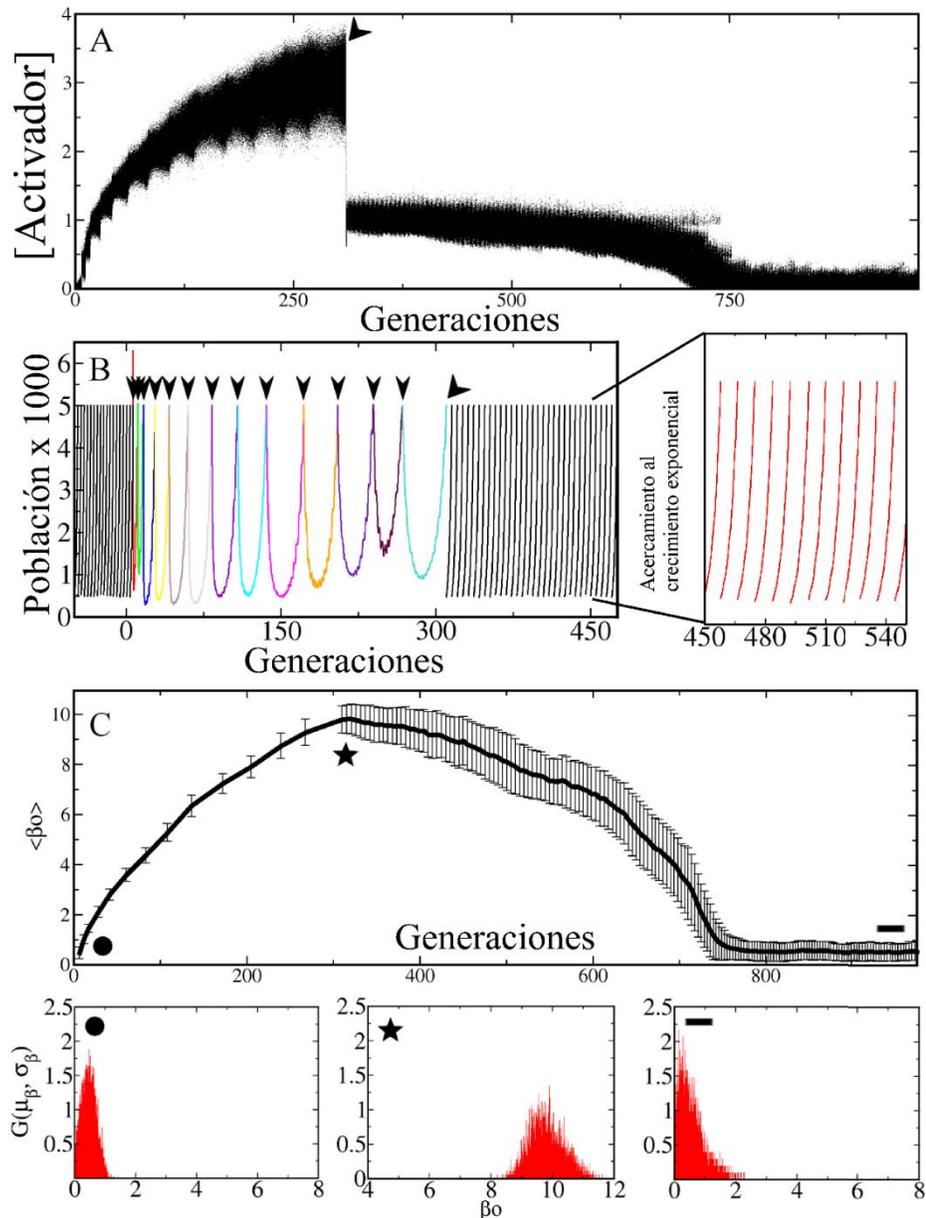
menor, pero tardan más tiempo en alcanzar las 5000 células, y que una vez removido el antibiótico, la población regresa a su tasa de crecimiento silvestre.

Dado que el crecimiento en ausencia de antibiótico es exponencial, si se deja a la población crecer sin restricciones, ésta alcanzaría en muy poco tiempo un tamaño imposible de seguir computacionalmente. Por esta razón, y basándonos en la forma que se hicieron los experimentos con bacterias [44, 51], cada que la población alcanzaba las 5000 células en ausencia de antibiótico, se hizo un muestreo aleatorio en donde se seleccionaba al 10% de la población para dejarla crecer nuevamente en un medio libre. Sin embargo, las gráficas del Panel A y B de la figura 5.3 no bastan para probar que el sistema es reversible.

El hecho de que la concentración de activador regrese a sus niveles basales (Figura 5.3-A), así como el que la población retome sus tasas de división normales (Figura 5.3-B), no significa necesariamente que las células han perdido por completo la resistencia a antibióticos. Es posible que algunas células de esta población hayan mantenido valores altos de  $\beta_0$  y en cuanto el antibiótico fuese introducido de nuevo, el activador así como las bombas de eflujo serían producidos en altas cantidades inmediatamente. Esto provocaría que dichas células sobrevivieran a altas concentraciones de antibiótico, haciendo que la resistencia se considerara como no reversible. Por esto, una forma de evidenciar que la población ha regresado a su susceptibilidad inicial, es mostrando que la distribución de donde las células obtienen sus valores para  $\beta_0$ , eventualmente regresa a su promedio inicial ( $\mu_0$ ).

La hipótesis es que dado que los valores de  $\beta_0$  están correlacionados a lo largo de la simulación, en ausencia de antibiótico aquellas células con valores más chicos de  $\beta_0$ , tendrán tiempos de división más cortos que sus contrapartes altamente resistentes. Por esto, en ausencia del proceso de selección por antibiótico, aquellas células con una velocidad de división mayor, tarde o temprano dominarán la población haciendo que el valor promedio de  $\beta_0$  regrese a su valor inicial. Reportamos en la Figura 5.3 (panel C) el promedio poblacional para  $\beta_0$  como función del tiempo. Observe que el promedio  $\mu_\beta = \langle \beta_0 \rangle$  aumenta conforme aumenta la concentración de antibiótico en el medio (Panel C). Luego, cuando es removido (flecha negra inclinada panel B) este promedio decrece gradualmente llegando a un valor muy similar al que tenía al inicio de la simulación. Los paneles inferiores muestran histogramas de frecuencia para los valores de  $\beta_0$  en la población, en tres tiempos distintos. Uno es al inicio de la simulación (círculo), el

otro es en el punto más alto de la resistencia (estrella) y el último es después de varias rondas de división celular en ausencia de antibiótico (línea horizontal). Puede verse



cómo, en efecto, la distribución  $G(\mu_\beta, \sigma_\beta)$  retorna a su promedio inicial ( $\mu_\beta \approx 0.5$ ).

**Figura 5.3. Reversibilidad del fenotipo resistente.** (A) Gráfica de seguimiento para el activador a lo largo de inducciones sucesivas de antibiótico y en ausencia del mismo. (B) Tamaño de la población como función del tiempo a lo largo de la simulación mostrada en (A). Las flechas indican cada uno de los shocks de antibiótico y la flecha inclinada señala el momento en el cual el antibiótico fue removido del medio. Al lado derecho se muestra una ampliación de la simulación en el cual se puede apreciar el crecimiento exponencial en ausencia de antibiótico. (C) Promedio de la tasa de transcripción  $\beta_0$  como función del tiempo. Las barras de error indican la desviación estándar de la población. Nótese cómo la desviación estándar aumenta conforme la concentración de antibiótico crece y llega a su máximo tiempo

después de que éste es removido del medio (Generación 500 aproximadamente). Los paneles inferiores muestran la distribución de  $\beta_0$  en la población al inicio (círculo), en el medio (estrella) y al final de la simulación (línea).

## 5.5. *Asimilación Genética*

Hemos mencionado con anterioridad que las escalas de tiempo para producir cambios fenotípicos en la población difieren considerablemente entre las mutaciones genéticas y las modificaciones epigenéticas <sup>[54]</sup>. Por lo que para poder observar algún cambio significativo en la eficiencia de las bombas, es necesario dejar pasar tiempo suficiente en la simulación para que se pueda producir un cambio significativo en el fenotipo. Al realizar simulaciones con periodos largos de selección, observamos que el fenotipo resistente se vuelve estable. Y aunque dejemos a la población sin antibiótico por periodos largos de tiempo, después de este periodo largo de selección, los índices de resistencia mantienen un nivel considerablemente mayor comparado con el de la población inicial, mostrando que el fenotipo ha perdido reversibilidad. Este fenómeno puede ser considerado análogo a la *asimilación genética* (Sección 3.4), en donde un fenotipo (alta producción de bombas) aparece inicialmente por cuestiones ambientales (introducción del antibiótico) y después es sustituido o fijado por un mecanismo de mayor estabilidad (una modificación genética que aumente la eficiencia de las bombas) <sup>[77]</sup>. Estos resultados coinciden con las observaciones experimentales reportadas por Adam y su grupo <sup>[51]</sup>.

Este experimento se llevó a cabo de forma muy similar al de la sección 5.4, en el cual se va aumentando la concentración del antibiótico gradualmente en el medio hasta obtener poblaciones altamente resistentes. Sólo que en esta ocasión, una vez alcanzados dichos niveles de resistencia, se mantuvo a la población en la última concentración alta de antibiótico por un periodo largo de tiempo (20 veces mayor al tiempo de selección) antes de quitarlo del medio.

Para medir el nivel de resistencia de la población a lo largo de este proceso, definiremos el Índice de Resistencia (IR) como la concentración de antibiótico más alta que puede soportar la población de forma que al menos el 10% de ella sea capaz de sobrevivir. Una medida muy similar puede ser encontrada en la literatura <sup>[51]</sup>. En la Figura 5.4 se reporta el IR de varias poblaciones sujetas a distintos números de shocks de antibióticos. En cada caso las flechas (Panel B y C) indican el tiempo en el cual el antibiótico es removido del medio. Es posible observar que el IR alcanzado por la población después del periodo sin

antibiótico, claramente depende del tiempo que la población pasó en contacto con el antibiótico. Siendo las poblaciones más resistentes, aquellas que permanecieron un mayor tiempo bajo selección. El caso que hace referencia al proceso de asimilación genética está representado por la curva azul, la cual representa el IR de una población que fue sometida a 15 shocks de antibiótico. Esta población fue dejada en la concentración del último shock a partir del tiempo marcado con el asterisco (Panel B), hasta el tiempo marcado por la flecha azul la cual indica la remoción del mismo (Panel C). Note que el IR incrementa de forma constante durante el periodo en el cual el antibiótico se mantiene fijo (Panel A). Puede verse también que el IR final, alcanzado después del periodo sin antibiótico, es casi cinco veces más alto que el de todas las demás poblaciones. En este experimento, la curva negra indica una población a la cual no se le sometió a ninguna concentración de antibiótico. Esto con el fin de probar que el efecto del aumento de la resistencia se debe puramente al contacto con el antibiótico y no a una posible deriva génica en la cual la misma naturaleza estocástica del proceso, un fenotipo resistente arbitrario se fije en la población. En la gráfica interior del panel D, se puede observar el histograma de frecuencias de la eficiencia de las bombas para la población al inicio de la simulación (símbolo de estrella) y al final de ella (círculo). Puede notarse que en un inicio la población tiene muy poca diversidad genética (marcada por una distribución muy estrecha en la eficiencia de las bombas), más al final de la simulación la población posee una mayor diversidad además de estar sesgada a eficiencias significativamente más altas que las iniciales.

En esta misma figura (Panel D) se reporta la evolución del promedio  $\mu_\beta$  y  $\mu_\epsilon$  a lo largo de la curva azul. Note que tan pronto se deja de incrementar la concentración de antibiótico en el medio,  $\mu_\beta$  empieza a decrecer y  $\mu_\epsilon$  se mantiene en aumento, estabilizándose hasta que el antibiótico es removido por completo del medio. Esto resulta interesante, pues sugiere que mientras haya antibiótico en el medio, la población se irá adaptando cada vez más a su presencia sin llegar a un estado estable, y dicha adaptación aumentará de forma no reversible el nivel de resistencia de la población.

Es importante enfatizar la diferencia entre el Índice de Resistencia (IR) y la Tasa de Supervivencia (TS). Una TS se define como la fracción de células que sobrevive a una inducción, y toma valores ubicados entre 0 y 1 ( $TS = \{0,1\}$ ) Siendo 1 cuando todas las células sobreviven y 0 cuando la población se extingue. Por el contrario, el IR es la concentración de antibiótico más alta que puede resistir la población con una  $TS = 0.1$ . Es

decir que al menos el 10% de las células que fueron sometidas a presión selectiva, sean capaces de mantenerse vivas. Por esto, el rango de los valores de IR va a estar determinado por el rango de concentraciones de antibiótico que la población pueda aguantar sin extinguirse. Este rango va a depender directamente de la distribución de valores para  $\beta_0$  y  $\epsilon_I$  en la población en cuestión. En cada célula, estos valores determinarán los puntos fijos del sistema. Dado que sólo un punto fijo existe por cada combinación de valores de  $\beta_0$  y  $\epsilon_I$ , el cambio permanente en el IR de la población no se debe a una transición entre puntos fijos de las ecuaciones, sino a que el punto fijo se mueve a lo largo de la evolución del sistema (Ver sección 5.6).

## 5.6. *Otros Experimentos*

**Variación de parámetros.** Con la finalidad de probar qué tan sensible es el modelo poblacional ante cambios de los parámetros usados para resolver el sistema de ecuaciones, decidimos explorar el espacio de éstos en la búsqueda de conjuntos de valores que mantuvieran los mismos resultados. Recordemos que los parámetros  $\beta_0$  y  $\epsilon_I$  se encuentran en constante cambio a lo largo de la evolución del sistema, pero todos los demás parámetros se mantienen fijos. En la Figura 5.5 mostramos cinco ejemplos en donde tres parámetros (antes fijos), son cambiados hasta en un orden de magnitud y esencialmente se obtienen los mismos resultados (Ver Figura 5.6). Los tres parámetros que se cambiaron son: la tasa de degradación del activador ( $\gamma_A$ ), la degradación del represor ( $\gamma_R$ ) y el aumento promedio de antibiótico entre dos shocks consecutivos ( $\Delta I_n$ ). En la Figura 5.6 se muestra el comportamiento de las poblaciones con los parámetros de la Figura 5.5 con excepción del cuarto triángulo que representa a los parámetros presentados en la Tabla 2 y cuyas gráficas se presentan en la sección 5.3

Note que estas simulaciones poblacionales mantienen el comportamiento observado en la sección 5.3. La expresión del activador aumenta con respecto a las inducciones sucesivas, y en todos los casos se observa un comportamiento escalonado indicando que una gran proporción de las células muere tras el aumento en el antibiótico externo (secciones estrechas). También se puede ver que al igual que en los experimentos previos, el tiempo que tarda la población en regresar a su tamaño de  $N = 5000$  aumenta proporcionalmente con la concentración de antibiótico. Esto es claro al ver el aumento gradual en la longitud de los escalones, pues cada aumento en la concentración del

activador corresponde a un aumento en la concentración de antibiótico, el cual sucede cuando la población alcanza las cinco mil células.

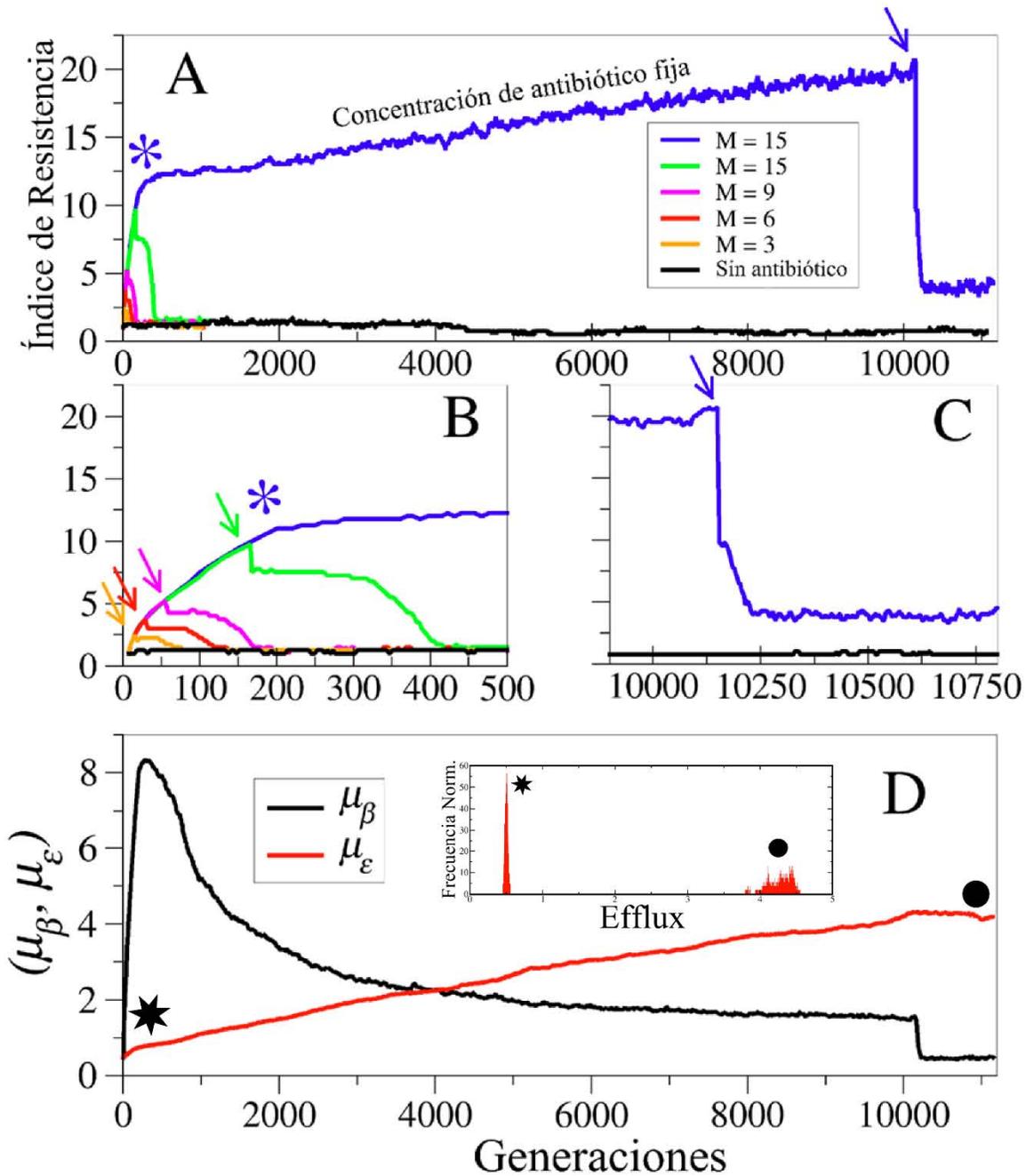


Figura 5.4. Estabilidad del fenotipo resistente. (A) Índice de Resistencia (RI) como función del tiempo para poblaciones sometidas a M shocks de antibiótico. (B) Ampliación de las primeras 500 generaciones. Las flechas indican el tiempo al cual el antibiótico es removido del medio. En el caso de la curva azul, el asterisco indica el último shock impuesto, a partir del cual la concentración de antibiótico se mantuvo constante. (C) Ampliación de las últimas 800 generaciones, mostrando el momento en el cual el antibiótico es removido del medio. (D)

Evolución del promedio  $\mu\beta$  y  $\mu\epsilon$  correspondientes a la curva azul. El recuadro interno muestra el histograma de frecuencias para la eficiencia de las bombas  $\epsilon_i$  al inicio (estrella) y al final de la simulación (círculo). Nótese que al inicio de la simulación la población tiene una homogeneidad genética muy alta (distribución de las eficiencias angosta), mientras que al final de la simulación la población se ha vuelto mucho más heterogénea y se ha recorrido hacia eficiencias más altas.

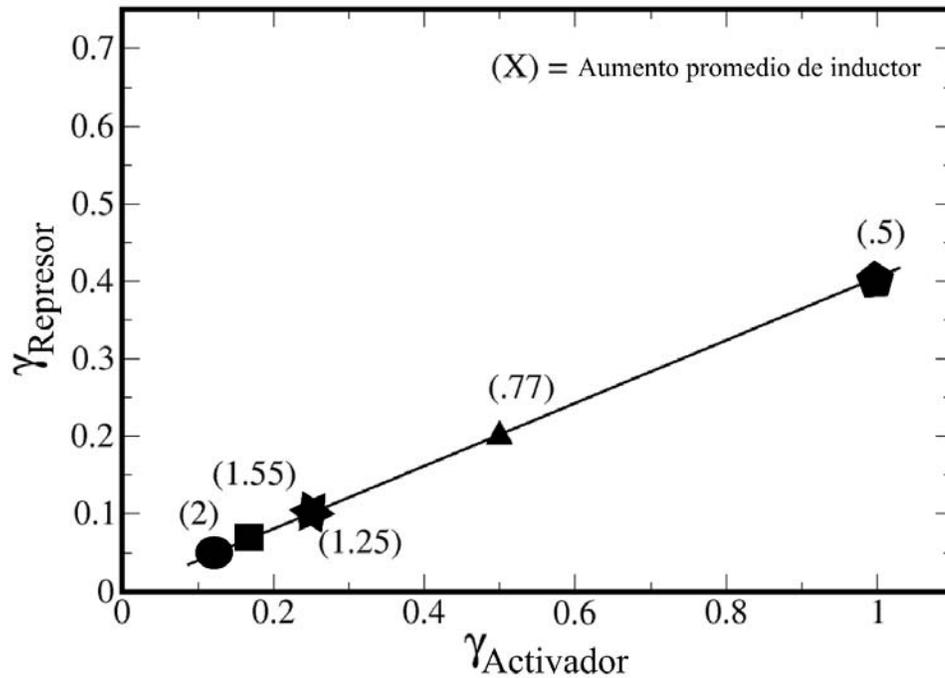


Figura 5.5. Robustez del modelo bajo cambios del valor de los parámetros. Cada figura geométrica representa un conjunto de valores para los tres parámetros  $\gamma_A$ ,  $\gamma_R$  y el incremento promedio de inductor entre dos shocks sucesivos. Todas estas simulaciones producen un comportamiento muy similar, lo cual indica que pese a que desconocemos los valores reales de los parámetros, los principios que rigen la dinámica del sistema, no dependen fuertemente del valor específico que estos tomen.

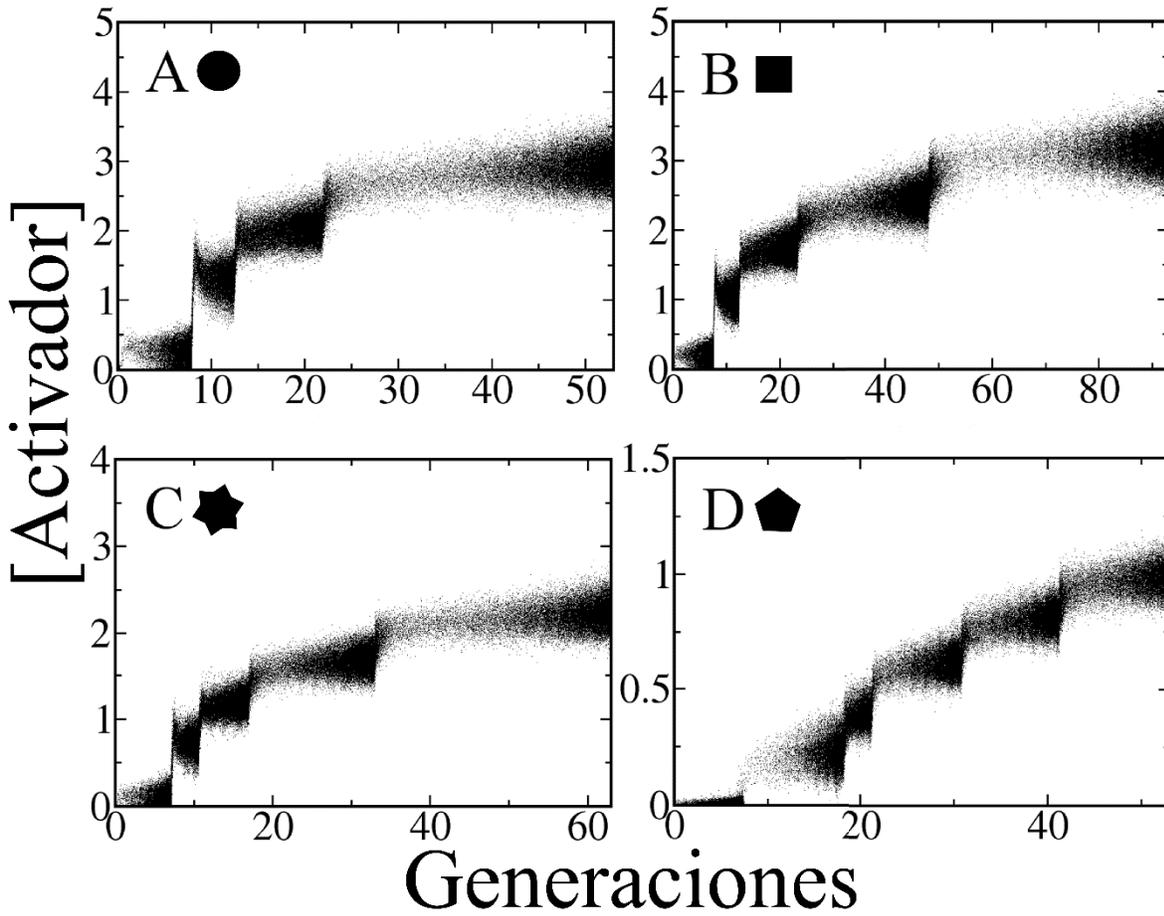
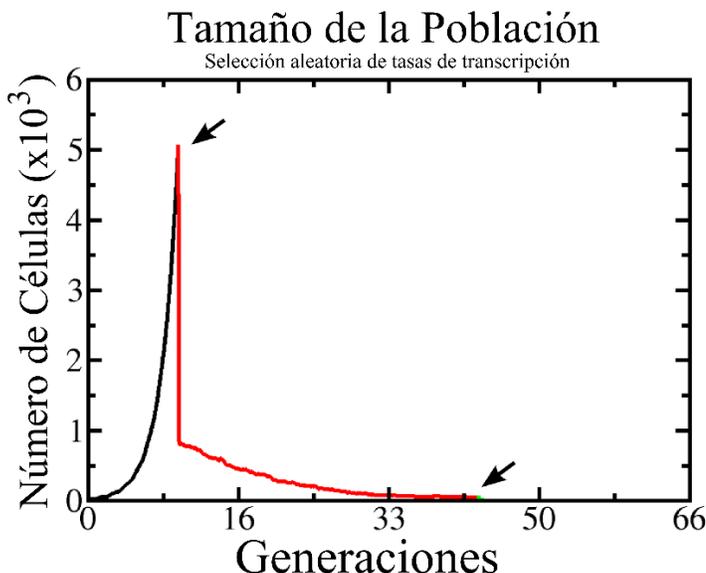


Figura 5.5. Gráficas de seguimiento para la concentración del Activador dadas las combinaciones de parámetros usadas en la Figura 5.5. Las gráficas están marcadas con el símbolo correspondiente de la Figura 5.5. Dado que el triángulo representa los parámetros usados en el resto del texto, su gráfica no es presentada pues puede verse en la Figura 5.2.

**Transiciones abruptas y discretas en el parámetro  $\beta_0$ .** Dado que se desconoce si el proceso de metilación del ADN genera cambios continuos o abruptos en las tasas de transcripción, hemos implementado una forma alternativa para simular el cambio en  $\beta_0$  a través de las divisiones celulares. Anteriormente habíamos modelado los cambios en las tasas de transcripción como un proceso continuo, en el cual al dividirse una célula las dos hijas resultantes obtenían valores de  $\beta_0$  cercanos al valor de la madre (Ver sección 5.1). En esta ocasión asumiremos que patrones que difieren aunque sea ligeramente, pueden implicar tasas de transcripción sumamente distintas. Es decir que aunque el patrón de la madre sea muy similar al que heredó a sus hijas, éstas pueden tener tasas de transcripción muy distintas entre sí. Estos cambios abruptos se contraponen a la forma continua en la que se implementó la herencia previamente. Nuestra forma de implementar esta suposición, fue haciendo que la distribución de donde las células obtienen el valor para  $\beta_0$  en lugar de ser Gaussiana (Sección 5.1) sea uniforme en el intervalo  $\{0, 10\}$ . Es decir que desde un inicio, la población puede dar origen a células con patrones de metilación correspondientes a valores muy altos de  $\beta_0$  (cerca de 10). No obstante las hijas de estas células pueden perder estas tasas altas de transcripción al seleccionar arbitrariamente valores bajos para  $\beta_0$  (dado que ahora se obtienen de distribuciones uniformes no correlacionadas entre sí). Los resultados de estas simulaciones (Figura 5.7) muestran que siguiendo este procedimiento la población no adquiere resistencia a pesar de la presencia de una mucho mayor variabilidad fenotípica. En la figura 5.7 se presenta la dinámica de esta población con alta variabilidad fenotípica pero carente de correlaciones entre células madres e hijas. Puede verse que tras la primera inducción (flecha negra a la izquierda), la población decae rápidamente hasta llegar a su completa erradicación (flecha negra a la derecha).



**Figura 5.7. Dinámica poblacional ante variabilidad uniforme en las tasas de transcripción. Tamaño de la población como función del tiempo. En esta simulación se muestra que cuando se opta por no correlacionar el parámetro  $\beta_0$  a lo largo de la simulación, pese a que exista una alta variabilidad fenotípica en la población, ésta no es capaz de permitir que la población evolucione ante inducciones sucesivas de antibiótico (flechas negras). El cambio en el color de la línea indica un aumento en la concentración de antibiótico.**

Otra de las suposiciones que se pusieron a prueba, fue el hecho de que los  $2^{12}$  patrones de metilación pueden generar un espectro continuo en los valores de  $\beta_0$ . Para evaluar esta suposición, discretizamos el intervalo para las tasas de transcripción  $\beta_0$  [0, 10] en 40 valores, restringiendo así los valores que podrán ser asignados a éste parámetro a lo largo de la simulación. Es decir:  $\beta_0 = n/4$  con  $n = 0, 1, 2, \dots, 40$ . En este caso, el mecanismo de herencia se simuló iniciando con 12 células, de las cuales 6 poseían el valor  $\beta_0 = 0.5$ , 3 células tenían el valor  $\beta_0 = 0.25$  y las otras 3 tenían  $\beta_0 = 0.75$ . Después se permitió a las células duplicarse como en todas las demás simulaciones anteriores, hasta llegar a las cinco mil células ( $N = 5000$ ).

En cada replicación las células obtuvieron un valor para  $\beta_0$  de acuerdo con las siguientes reglas: Sea  $\beta_0(g) = n_g/4$  el valor de  $\beta_0$  para una célula madre en la generación  $g$ . Entonces, tras la división celular, el valor de cada una de las hijas,  $\beta_0(g+1)$  estará dado por:

$$\beta_0(g+1) = (n_g + 1)/4 \text{ con probabilidad } 0.25$$

$$\beta_0(g+1) = (n_g - 1)/4 \text{ con probabilidad } 0.25$$

$$\beta_0(g+1) = n_g/4 \text{ con probabilidad } 0.5$$

Esto significa que con una probabilidad igual a 0.5, la célula hija adquirirá el mismo valor que su madre, y con una probabilidad igual (0.25 + 0.25 por cada uno de los lados), adquirirá un valor adyacente a la izquierda o a la derecha del de la madre, obtenida del set de valores discretizado mencionado anteriormente. Los resultados de estas simulaciones se muestran en la Figura 5.8 a través de gráficas de seguimiento para el activador. Si comparamos esta figura con la simulación que usa una transición continua (Ver Figura 5.3) los resultados son muy parecidos entre sí a pesar de que el número de valores discretos que estamos utilizando para  $\beta_0$  es tan solo el 1% de los valores teóricamente posibles. Estos experimentos muestran que basta con que una pequeña proporción de los distintos patrones de metilación posibles confieran una expresión genética distinta para que el fenómeno de la resistencia adaptativa aparezca y no es necesario suponer que todos los posible patrones de metilación dan como resultado una tasa de expresión distinta.

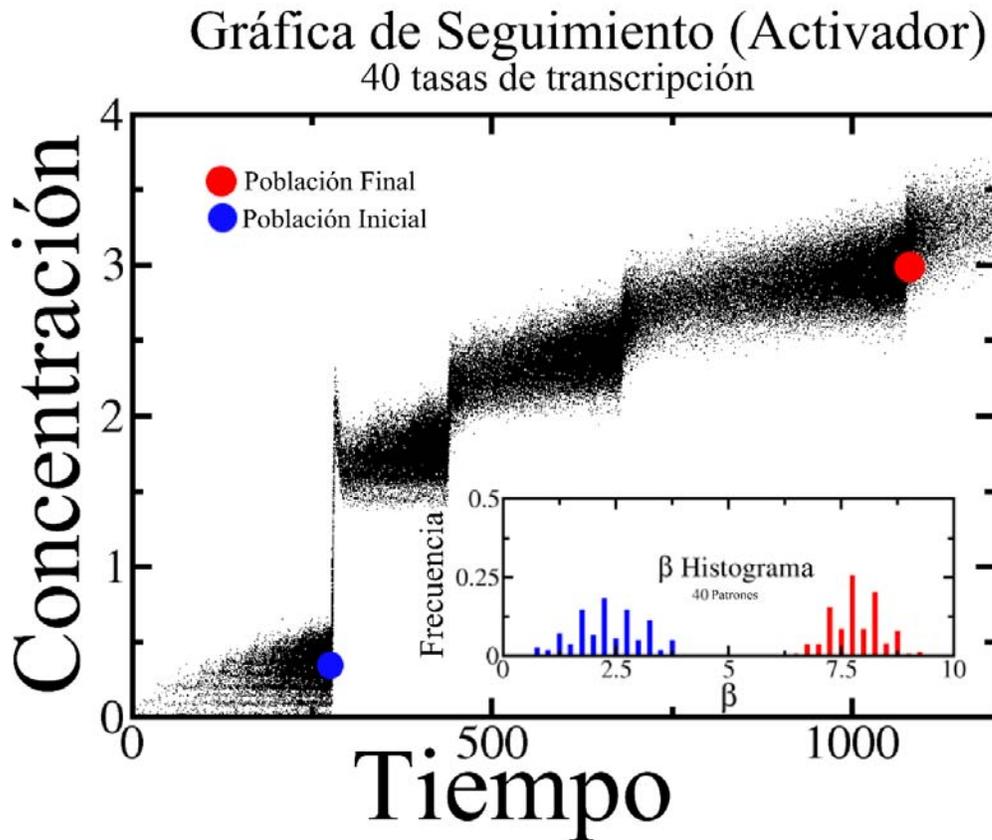
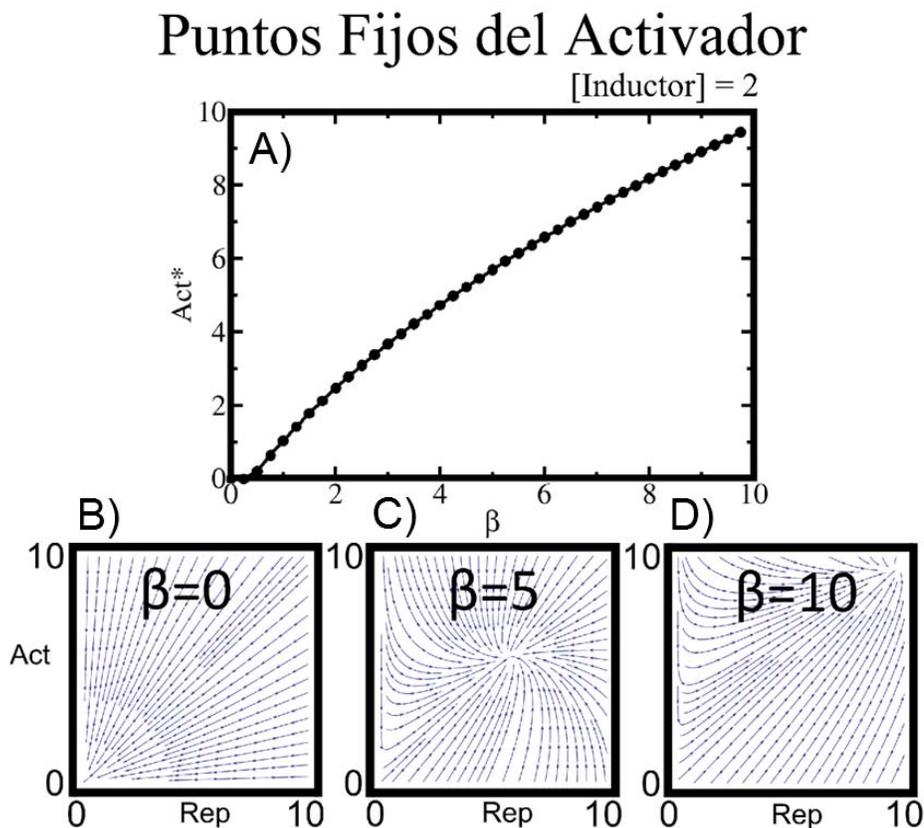


Figura 5.8. Gráfica de seguimiento para el Activador, usando transiciones discretas entre los 40 valores posibles para  $\beta_0$ . En el histograma interno se muestra la frecuencia de los valores de  $\beta_0$  de la población al inicio de la simulación y al final de la misma. Puede observarse que a pesar de que el número de posibles patrones de expresión se redujo al 1%, el mismo comportamiento se mantiene (Ver sección 5.3). Los histogramas se presentan con la finalidad de que el lector observe que en efecto la distribución de valores para  $\beta_0$  es discreta, y que ésta a lo largo de la simulación sufre un corrimiento hacia los valores más altos de expresión (punto e histograma rojo) debido a las inducciones sucesivas de antibiótico al igual que sucede tomando los cambios en  $\beta_0$  en un intervalo continuo.

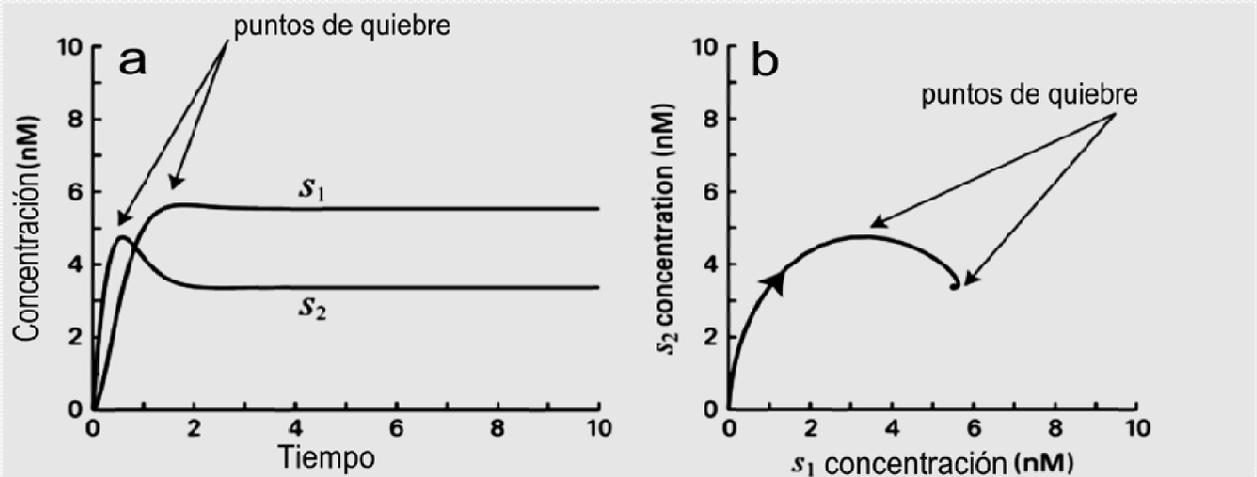
**Puntos Fijos.** Con el fin de evaluar si la adquisición de los altos niveles de resistencia en la población es debida a un proceso de selección activa (células con más o mejores bombas de eflujo vs antibiótico) y no por una simple transición entre puntos fijos en la expresión del activador, calculamos los puntos estables del sistema de ecuaciones para la red de resistencia reducida. El Panel A de la Figura 5.9 muestra cómo cambia el punto fijo del activador con respecto a  $\beta_0$  mientras que los paneles inferiores muestran un análisis de plano fase Activador–Represor para tres valores distintos de  $\beta_0$  (Ver apartado, Análisis de plano Fase). Este plano muestra para cada par de concentraciones de Activador y Represor, la dirección del cambio en la concentración de éstos (derivada). Puede observarse claramente que existe sólo un punto fijo en la región de los parámetros explorada  $[0, 10]$ . Puede concluirse que los cambios en la resistencia observada no se deben a saltos entre puntos fijos, sino más bien a un desplazamiento suave del punto fijo a través de la simulación.



**Figura 5.9.** (A) Puntos fijos del activador con respecto a cambios en  $\beta_0$  dada una concentración fija de antibiótico. (B, C y D) Diagramas de flujo en el Plano Activador-Represor para los distintos valores de  $\beta_0$ . Puede verse que en el rango de valores explorado en este trabajo, sólo existe un punto fijo para cada valor de  $\beta_0$ .

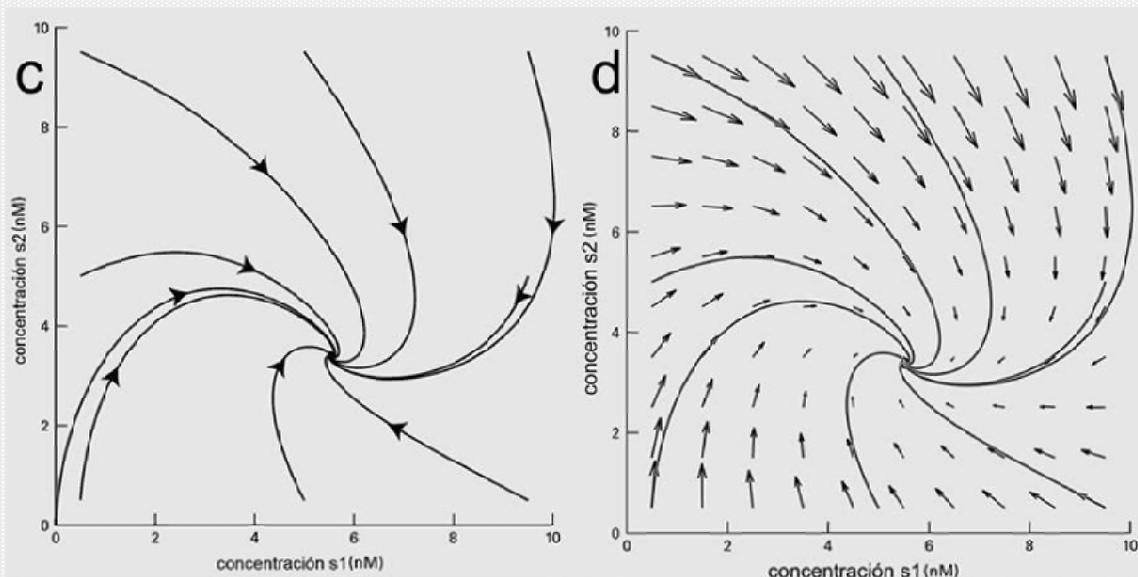
## Análisis del Plano-Fase

El plano fase representa en cada uno de sus ejes la concentración de dos especies y cómo éstas cambian con respecto del tiempo, dada una condición inicial. Por ello, la evolución a partir de cada condición inicial (panel a) en el plano fase toma la forma de una curva e indica cómo es que varía la concentración de un elemento con respecto del otro a través del tiempo (panel b).



Si representáramos varias condiciones iniciales el plano fase se vería como el panel c. En este caso, todas las trayectorias convergen a un mismo punto fijo. Y esta representación nos muestra una clara imagen sobre cómo es que se comporta el sistema de forma general.

Una alternativa también muy usada para representar el comportamiento general de sistemas dinámicos son los planos vectoriales (panel d). En este caso se usan flechas para indicar el cambio en las concentraciones en cada uno de los puntos representando con el conjunto de flechas una especie de flujo del sistema. La dirección de cada flecha se obtiene mediante la razón entre la derivada de ambos elementos. Es decir que en cada punto la pendiente de cada flecha se calcula como:  $\frac{ds_1}{dt} / \frac{ds_2}{dx}$

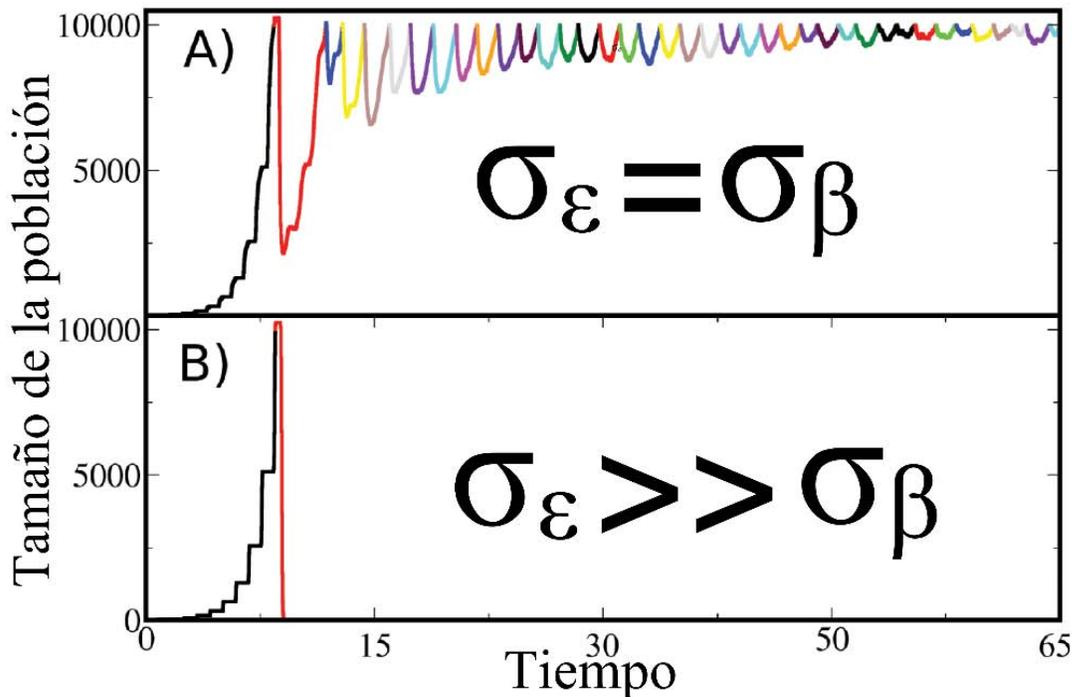


**Escenarios alternativos.** Además de los cuatro escenarios planteados en la sección 5.2 decidimos explorar otros escenarios biológicamente posibles bajo los cuales el fenómeno de la resistencia adaptativa pudiese emerger. Por ejemplo, un incremento en la tasa de mutaciones genéticas fue anteriormente propuesto como explicación posible a este fenómeno <sup>[44]</sup>. A pesar de que recientemente se observó que las tasas de mutación no pueden explicar el surgimiento de la resistencia adaptativa debido a las altas tasas de reversibilidad <sup>[51]</sup>, quisimos ver el comportamiento de la población bajo esta situación. Para ello, exploramos dos opciones en el modelo que incorpora la Herencia Mixta (ver sección 5.2):

- Hicimos que las varianzas para las dos Gaussianas usadas fueran igualmente altas, es decir:  $\sigma_{\beta} = \sigma_{\varepsilon} = \max(\sigma_{\beta}, \sigma_{\varepsilon})$
- Intercambiamos los valores de las varianzas  $\sigma_{\varepsilon}$  y  $\sigma_{\beta}$ , de forma que  $\sigma_{\varepsilon} \gg \sigma_{\beta}$

En la Figura 5.10 se muestran los resultados para el escenario en donde las desviaciones estándar se igualaron. Puede observarse que dado que ambos procesos (mutación genética y cambios epigenéticos) poseen una enorme variabilidad, la población adquiere desde el inicio de la simulación un nivel muy alto de resistencia, presentando muy poca muerte celular a lo largo de la sucesión de antibiótico (~ 80% de supervivencia en cada incremento de antibiótico). Este resultado contrasta enormemente con los datos experimentales en los que se reporta que la supervivencia para bajas concentraciones de antibiótico está cerca del 20% <sup>[44, 51]</sup>. De hecho puede verse que tras un periodo de tiempo muy corto y a pesar de hacer incrementos grandes en la concentración del antibiótico, el número de células que mueren se reduce rápidamente.

El panel B de la Figura 5.10 muestra las simulaciones para el segundo escenario en donde las desviaciones estándar fueron intercambiadas. Podemos ver que cuando la variabilidad epigenética es disminuida y la genética es aumentada, la población no puede sobrevivir a más de un shock de antibiótico. Esto concuerda con la hipótesis de que la variabilidad genética por sí sola, por más grande que sea, no puede explicar el surgimiento de la resistencia adaptativa.



**Figura 5.10** Altas tasas de mutación. (A) Tamaño de la población a lo largo de varios shocks de antibiótico (cada cambio de color indica un nuevo shock). En este caso la variabilidad genética ( $\sigma_{\varepsilon}$ ) fue equiparada con la variabilidad epigenética ( $\sigma_{\beta}$ ). Puede verse cómo la población se vuelve casi inmediatamente resistente a cualquier concentración de antibiótico. Cada cambio de color indica un aumento en la concentración de antibiótico. (B) Tamaño de la población a lo largo de múltiples shocks, bajo un escenario en donde la variabilidad genética es mucho mayor a la variabilidad epigenética. En este caso la población muere inmediatamente después de entrar en contacto con el primer shock de antibiótico (línea roja).

Otro escenario para el surgimiento de la resistencia adaptativa es la transmisión de madres a hijas de bombas de eflujo activas. Este escenario podría ser posible, dado que existen mecanismos que promueven una polarización en la división celular <sup>[77]</sup> o bien a través de proteínas estables que al durar por más de un ciclo celular y ser transmitidas de madre a hijas, le confieran a éstas últimas una ventaja evolutiva. De esta forma, las hijas nacerían con una mayor concentración de bombas que sus predecesoras, aumentando su capacidad de bombeo y por lo tanto de resistencia a antibióticos. Y en caso de existir polarización, es decir que la repartición de bombas activas de la madre a las hijas fuera desequilibrada, aquella célula hija que recibiera el mayor número de bombas presentaría un fenotipo resistente más prominente.

A pesar de que hay evidencia experimental que demuestra que las bombas en efecto tienden a agruparse en la membrana celular <sup>[25]</sup>, hasta donde sabemos, no hay prueba alguna que demuestre que las bombas se segregan de forma sesgada entre las hijas, ni de que exista

una transmisión de bombas estables y que esto conlleve un aumento en el índice de resistencia. No obstante, hemos implementado en nuestro modelo los siguientes tres escenarios, con el fin de determinar si alguno pudiese explicar también el surgimiento gradual del fenotipo resistente:

1. **Segregación aleatoria.** La concentración de bombas en cada división celular va a ser dividida entre las hijas de forma completamente aleatoria, usando una variable  $r$  con distribución uniforme en el intervalo  $[0,1]$ . En cada división celular, una hija recibirá una fracción  $r$  de las bombas de la madre, mientras que la otra recibirá una fracción  $1-r$ .
2. **Segregación sesgada 90%-10%.** En este caso, haremos que en cada división celular, una de las hijas reciba el 90% de las bombas de la madre, mientras que la otra reciba el restante 10%.
3. **Segregación equitativa 50%-50%.** En este caso la segregación de bombas entre las hijas seguirá proporciones igualitarias.

Las simulaciones para estos escenarios son similares a las realizadas en la sección 5.3, sólo que con los cambios mencionados anteriormente y sin implementar ni la herencia genética ni la epigenética. Nuestras pruebas iniciales indicaron que bajo estas circunstancias, ninguna de las poblaciones puede resistir a más de un shock de antibiótico. No obstante, hicimos una búsqueda en el espacio de parámetros de las ecuaciones para encontrar un conjunto de valores que permitiera que la población pudiese resistir al menos los dos primeros shocks de antibiótico. Esta búsqueda resultó en los parámetros mostrados en la Tabla 3 y en la simulación mostrada en la Figura 5.11 para el escenario de segregación aleatoria (Los dos escenarios restantes dan resultados casi idénticos). En este caso podemos ver que no es posible explicar el surgimiento de la resistencia adaptativa con este mecanismo. Pues tan pronto como se añade antibiótico al medio, la mayor parte de la población muere y sólo sobreviven unas cuantas células que en efecto son resistentes, pero son incapaces de dividirse dada su alta concentración de bombas. Contrario a lo que se observa con la resistencia adaptativa, estas células sobrevivientes son extremadamente resistentes, pues sin importar la cantidad de antibiótico que se le añada el medio, éstas no mueren. Este fenómeno es conocido como ***persistencia bacteriana*** y ha sido observada en poblaciones reales de bacterias <sup>[78]</sup>.

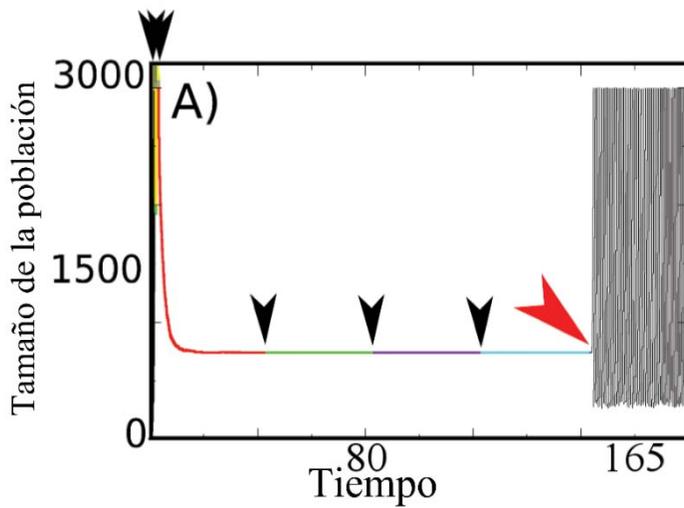


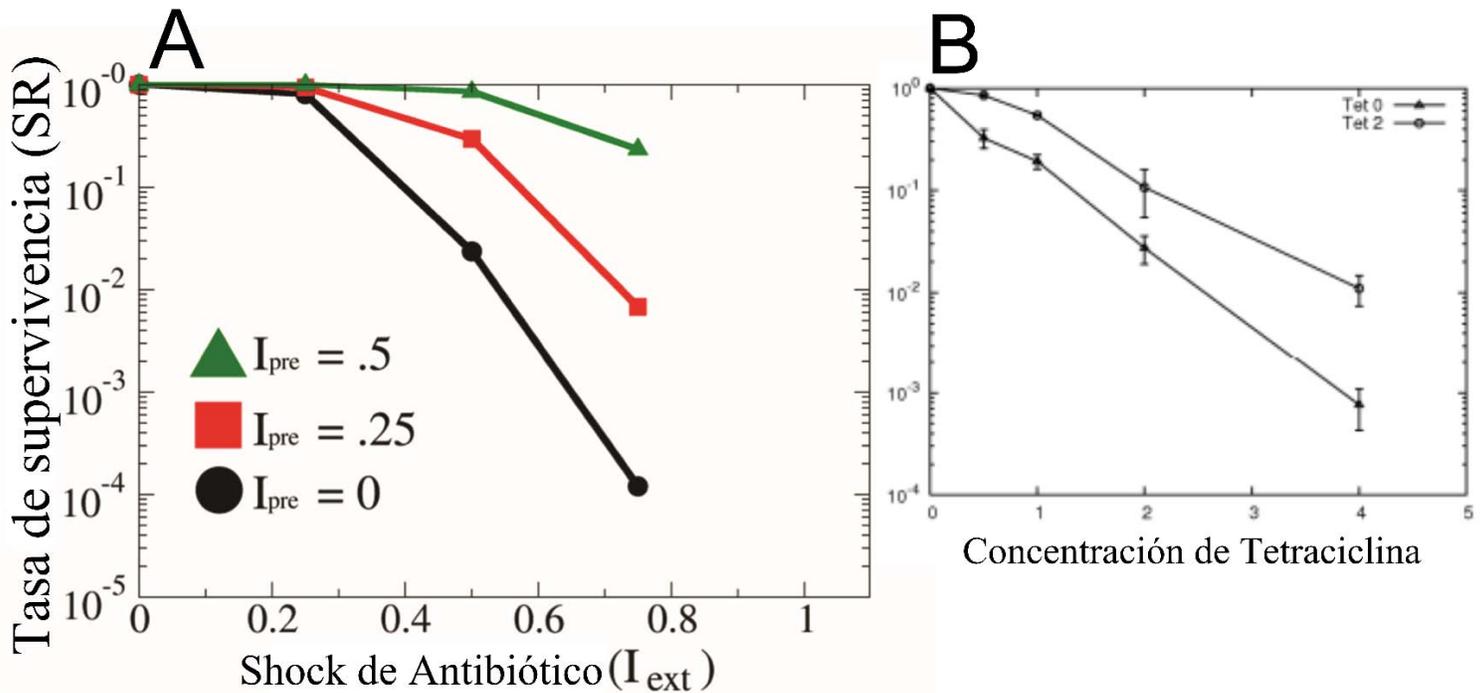
Figura 5.11. Escenarios alternativos. Se presenta el tamaño poblacional a lo largo de múltiples inducciones de antibiótico (flechas negras) para el escenario de segregación aleatoria de bombas. Puede observarse que el conjunto de células que logra sobrevivir a las primeras inducciones, se vuelve completamente resistente a cualquier concentración de antibiótico, con el costo de que no es capaz de dividirse. Esta capacidad de dividirse se recupera hasta que el antibiótico es quitado del medio (flecha roja).

Tabla 3

Parámetro		Valor
$\gamma_A$		0.5
$\gamma_R$		0.25
$\gamma_P$		0.5
$\gamma_Q$		1
$u$		1
$\varepsilon_F$		0.5
$K_{R^*}$		0.05
$K_I$		0.05
$\theta_F$		6
$\sigma_\varepsilon$		0.01
$\beta_P$		0.3
$\theta_I$		0.4
$\mu_{\text{noise}}$		0
$\mu_\beta$		1
$\mu_\varepsilon$		2
$\Theta_{\text{diff}}, \Theta_{\text{int}}$		0.1
$\rho$		1
$K_A$		1
$\sigma_{\text{noise}}$		0.1
$\sigma_\beta$		0.25
$F_{\text{ext}}$		10
$\beta_Q$		0.1

Tabla 3. Valores de los parámetros usados para llevar a cabo la simulación de la figura 5.11

**Experimentos de Pre-inducción.** Es sabido que células que han estado en contacto con concentraciones no letales de antibiótico por periodos considerables de tiempo, muestran una mayor resistencia al ser comparadas con sus congéneres incautos [51]. Para probar si nuestro modelo es capaz de reproducir estas observaciones experimentales, iniciamos una simulación con 10 células y las dejamos dividirse hasta alcanzar un tamaño de  $N = 10^6$  células en una concentración baja de antibiótico  $I_{pre}$ . Una vez alcanzado este tamaño poblacional, se incrementó el antibiótico ( $I_{ext}$ ) hasta superar la concentración letal y se midieron las tasas de supervivencia de la población. La Figura 5.12 muestra esta tasa de supervivencia como función de la concentración  $I_{pre}$  y con cinco diferentes concentraciones  $I_{ext}$ . Si comparamos esta gráfica (Figura 5.11-A) con los datos obtenidos experimentalmente [51] (ver Figura 5.11-B), podemos apreciar como en ambos casos, aquellas poblaciones que fueron previamente expuestas a antibióticos, poseen un índice de resistencia mucho mayor que aquellas a las que se les aplicó el shock sin haber tenido contacto previo con el antibiótico.



**Figura 5.12. Experimentos de preinducción.** A) Se muestra la tasa de supervivencia (SR) para poblaciones que han sido sometidas a concentraciones bajas de antibióticos ( $I_{pre}$ ), previo al shock letal ( $I_{ext}$ ). B) La gráfica representa los datos experimentales obtenidos en [51]. Tanto las simulaciones como los datos experimentales muestran una clara relación entre haber estado en contacto previo con un antibiótico y el hecho de tener una mayor tasa de supervivencia dado un shock letal posterior.

# 6

## Discusión y conclusiones

El fenómeno de la resistencia adaptativa emerge cuando una población de bacterias es sometida a antibióticos cuya concentración se aumenta gradualmente. De esta forma, las bacterias pueden adquirir niveles de resistencia sumamente altos en muy poco tiempo. Sin embargo, una de las características principales de esta resistencia es el hecho de que es sumamente inestable. Cuando el antibiótico es removido del medio de cultivo, las bacterias pierden el fenotipo resistente en unas pocas generaciones. Trabajos previos alrededor de este tema, han sugerido que procesos de herencia epigenética mezclados con la presencia de heterogeneidad fenotípica podrían explicar la emergencia de este fenómeno <sup>[44, 51, 59]</sup>. Sin embargo, el papel que juegan estos procesos no ha sido evaluado. Además de que los mecanismos detrás de las altas tasas de reversibilidad siguen siendo desconocidos.

En este trabajo presentamos un modelo teórico que evalúa un conjunto de mecanismos biológicos con el fin de mejorar el entendimiento sobre el surgimiento, evolución y reversibilidad de la resistencia adaptativa. Nuestro modelaje inicia con la construcción de un modelo unicelular dinámico basado en una de las redes de regulación de bombas de eflujo más importantes en bacterias Gram Negativas. Esto se debe a que estudios previos han mostrado la importancia de estas bombas en la emergencia de la resistencia adaptativa. En este punto, el modelo incorpora datos experimentales reportados en la literatura tales como las interacciones entre los elementos de la red, así como observaciones cualitativas como la predominancia de unos factores de transcripción sobre otros. La calibración de este modelo se hizo por medio de comparaciones con mediciones experimentales de células silvestres con y sin antibiótico, así como con mediciones de cepas mutantes carentes de bombas de eflujo funcionales.

Posteriormente implementamos los procesos de división y muerte celular así como procesos de variabilidad y herencia genética y epigenética a un conjunto de células, cada una representada por una copia del modelo unicelular. Al seguir la evolución de esta población de células simuladas, a través de incrementos sucesivos de antibióticos, logramos demostrar que incluyendo heterogeneidad y correlaciones madre-hija en las tasas de transcripción de los reguladores principales de la red de bombas, el modelo es capaz de explicar la emergencia de la resistencia adaptativa, así como reproducir una amplia gama de fenomenologías observadas experimentalmente, incluyendo la baja estabilidad del fenotipo.

En nuestro modelo al igual que como se reporta en la literatura <sup>[54]</sup>, las mutaciones genéticas por si solas resultaron incapaces de explicar la emergencia de la resistencia adaptativa. No obstante, su inclusión resultó de gran importancia en las simulaciones en las que se dejó a la población en contacto con el antibiótico por periodos prolongados de tiempo, dando como resultado un incremento permanente en los niveles de resistencia de la población. Por otro lado fue mediante la introducción de un costo asociado a la producción y funcionamiento de las bombas de eflujo, que se logró reproducir la reversión al fenotipo susceptible cuando el antibiótico era removido del ambiente.

Reportes en la literatura previos a este trabajo <sup>[51, 59]</sup> han sugerido que la resistencia adaptativa es una consecuencia directa de la estocasticidad inherente a la expresión genética, y que aquellas células que por probabilidad tienen una mayor concentración de bombas son las que sobreviven los incrementos sucesivos de antibióticos. Sin embargo, a través de nuestro modelo poblacional, mostramos que a pesar de que la heterogeneidad fenotípica es de suma importancia, no es suficiente para generar un incremento en la resistencia de la población. Pues para lograr reproducir las observaciones experimentales, resulta necesario incluir una correlación en los patrones de expresión genética a través de las divisiones celulares. Específicamente, esta correlación debe suceder en las tasas de transcripción de los reguladores de la producción de las bombas de eflujo. Estas correlaciones fueron modeladas basándose en un mecanismo de herencia epigenético, el cual permite cambios relativamente rápidos en los patrones de expresión de la célula, al mismo tiempo que da suficiente flexibilidad al sistema para que en caso de que el fenotipo resistente tenga alguna desventaja (ej. tasas de crecimiento desaceleradas), la población pueda regresar a su estado anterior cuando la presión selectiva haya terminado.

Basados en datos experimentales, una investigación previa <sup>[54]</sup> sugirió que la metilación del ADN pudiese ser un mecanismo muy adecuado para llevar a cabo la herencia epigenética. Esta propuesta se basa principalmente en el hecho de que la metilación puede producir distintos patrones de expresión genética entre madres e hijas (ver apartado *mecanismos de herencia epigenéticos*), al mismo tiempo que promueve una heterogeneidad mayor que las mutaciones genéticas. Los resultados presentes en este trabajo sustentan esta idea e identifican al operón regulatorio de la red de producción de bombas de eflujo, como el blanco más probable de sufrir esta metilación.

El punto central de este trabajo no es decir que las correlaciones entre madre e hijas se llevan a cabo gracias a la metilación del ADN. Sino que una variabilidad en la expresión genética de la red de producción de bombas de eflujo, correlacionada a lo largo de las divisiones celulares, es necesaria para el surgimiento de la resistencia adaptativa. Se lleve a cabo de la manera que sea. No obstante, proponemos a la metilación del ADN como un muy probable mecanismo, dado que los patrones de metilación pueden afectar las tasas de transcripción genética, al mismo tiempo que pueden ser transmitidos de madres a hijas. Esto sumado al hecho de que la región reguladora de las bombas de eflujo es blanco de la metilación y que bacterias incapaces de metilar el ADN son mucho más susceptibles a la presencia de antibióticos que sus contrapartes silvestres <sup>[51]</sup>.

Otra de las conclusiones derivadas de este trabajo, es que la pérdida de la reversibilidad de la resistencia, observada cuando se deja a la población en contacto con el antibiótico por un periodo largo de tiempo, se debe a una forma de asimilación genética. Es decir que el fenotipo de resistencia originalmente producido como respuesta a la presencia de antibióticos (consecuencia de una mayor producción de bombas de eflujo), es posteriormente codificado genéticamente (mediante un aumento en la eficiencia de las bombas) haciendo que el fenotipo se vuelva más estable. Pues a pesar de que las modificaciones genéticas sean poco frecuentes en comparación con los cambios epigenéticos, y por lo mismo insuficientes para salvar a la población inicialmente, éstos cobran importancia a largo plazo, volviéndose una forma alternativa de resistir la presencia de antibióticos, sin tener efectos adversos.

La red de regulación usada para nuestras simulaciones numéricas está basada en la red regulatoria de AcrAB-TolC, la cual es una de las redes de regulación de bombas de eflujo más conocidas actualmente. A pesar de que se conocen los valores de algunas de las

constantes cinéticas que gobiernan el comportamiento de esta red, la gran mayoría de ellos no ha sido reportada en la literatura. En este trabajo nuestro objetivo no fue encontrar los valores exactos de estos parámetros, sino determinar los mecanismos principales que pudiesen explicar y reproducir la fenomenología observada experimentalmente en torno a la resistencia adaptativa. Sin embargo, en la sección 5.6 presentamos una evaluación de la región de valores para algunos de los parámetros bajo los cuales nuestros resultados se mantienen. Consideramos que como perspectiva a futuro de este proyecto podría incluirse una búsqueda exhaustiva en el espacio de valores de estas constantes cinéticas, pues sus valores específicos podrían revelar restricciones dinámicas o temporales importantes, tales como las escalas de tiempo específicas en las cuales deben ocurrir los cambios genéticos y los epigenéticos, o bien la cantidad de bombas que la célula debe producir para tener un determinado nivel de resistencia.

Además de explorar las distintas combinaciones de herencia genética y epigenética, implementamos una serie de escenarios alternativos para el posible surgimiento de la resistencia adaptativa. Estos escenarios incluyen altas tasas de mutación genética (aumentando la variabilidad de la eficiencia de las bombas  $\sigma_\epsilon$ ), o bien una división celular polarizada en la que bombas con una vida media más larga que un ciclo celular, son heredadas a las hijas de forma desigual, provocando que unas células tengan mayor posibilidad de sobrevivir. Puede verse en la sección 5.6, ninguno de estos mecanismos fue capaz de explicar la fenomenología asociada a la resistencia adaptativa.

Una de las implicaciones prácticas de este trabajo es la pérdida de la reversibilidad de la resistencia adaptativa, seguida a un contacto constante con antibióticos. Nuestras simulaciones presentadas en la sección 5.5 sugieren que cuando la concentración de antibiótico se mantiene constante por largos periodos de tiempo, la población de bacterias es capaz de desarrollar mecanismos estables de resistencia. Basados en esto, hacemos la observación de que los tratamientos hospitalarios en los cuales se le suministra al paciente antibiótico vía intravenosa a concentración constante <sup>[79, 80]</sup>, pueden provocar que aquellas bacterias que hayan sido capaces de resistir las primeras inducciones, ya sea por encontrarse dentro de biofilms o granulomas u otra razón, desarrollen mecanismos de resistencia codificados genéticamente. Siendo éstos últimos mucho más estables que aquellos que les permitieron sobrevivir en un inicio. Las consecuencias inmediatas de esto son la generación de cepas nosocomiales altamente resistentes, que no presentan desventajas evolutivas en comparación con sus contrapartes silvestres.

Nuestro modelo teórico proporciona una explicación, plausible y biológicamente relevante para el surgimiento de la resistencia adaptativa. Además de que no solamente predice el comportamiento de una población sujeta a distintas concentraciones de antibiótico, sino que explica una amplia colección de observaciones, antes no relacionadas, tales como: la reversibilidad del fenotipo resistente, la asimilación genética, e incluso las tasas de supervivencia de poblaciones pre-inducidas con concentraciones bajas de antibióticos.

# Referencias

1. On the antibacterial action of cultures of a penicillium with special reference to their use in the isolation of B. Influenzae. By Alexander Fleming. From the Laboratories of the Inoculation Department, St Mary's Hospital, London. Received for publication: May 10th, 1929.
2. PENICILLIN AS A CHEMOTHERAPEUTIC AGENT. E. Chain, Ph.D. Cambridge, H.W. Florey, M.B. Adelaide, A.D. Gardner, D.M. Oxford, F.R.C.S., N.G. Heatley, Ph.D. Cambridge, M.A. Jennings, B.M. Oxford, J. Orr-Ewing, B.M. Oxford, A.G. Sanders, M.B. London, The Lancet, Volume 236, Issue 6104, 24 August 1940, Pages 226–228, Originally published as Volume 2, Issue 6104
3. The First Use of Penicillin in the United States. Grossman CM. Ann Intern Med. 2008;149:135-136. doi:10.7326/0003-4819-149-2-200807150-00009
4. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. Rustam I. Aminov, Front Microbiol. 2010; 1: 134
5. The introduction of ‘chemotherapy’ using arsphenamine – the first magic bullet. KJ Williams J R Soc Med. 2009 Aug 1; 102(8): 343–348.
6. Treatment of Human Puerperal Infections and of experimental infections in mice with Prontosil. Leonard Colebrook, Méave Kenny. The Lancet Volume 227, Issue 5884, 6 June 1936, Pages 1279–1281
7. Platforms for antibiotic discovery, Kim Lewis, Nature Reviews Drug Discovery 12, 371–387 (2013) doi:10.1038/nrd3975 Published online 30 April 2013
8. Approved Drug Products with therapeutic equivalence evaluations. 35<sup>th</sup> Edition. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research Office of Medical Products, and Tobacco Office of Generic Drugs 2015.
9. Encyclopedia Britannica, Encyclopædia Britannica, Inc, ISBN 1-59339-292-3
10. Infectious Disease Emergence: Past, Present, and Future. Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats. Microbial Evolution and Co-Adaptation: A Tribute to the Life and Scientific Legacies of Joshua Lederberg: Workshop Summary. Washington (DC): National Academies Press (US); 2009. 5, Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45714/>
11. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. CDC, U.S. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention.
12. The Bacteria Fight Back, Gary Taubes, Science 18 July 2008: Vol. 321 no. 5887 pp. 356-361 DOI: 10.1126/science.321.5887.356
13. Origins and evolution of Antibiotic Resistance. Julian Davies, Dorothy Davies, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2010 p417-433
14. New Animal Drugs and New Animal Drug Combination Products Administered in or on Medicated Feed or Drinking Water of Food-Producing Animals: Recommendations for Drug

Sponsors for Voluntarily Aligning Product Use Conditions with GFI #209, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine December 2013

15. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Fernando Baquero, José-Luis Martínez and Rafael Canto. *Current Opinion in Biotechnology* 2008, 19:260–265
16. Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud en México, Estudios Especiales de la Secretaría de Salud. Informe documental en extenso. México D.F. 11 de Noviembre 2011.
17. Management of upper respiratory tract infections in children. MF Cotton, MMed, PhD, DTM&H, Cert(ID), S Innes, MBBCh, MRCPCH, H Jaspan, MD, PhD, A Madide, FCPaed(SA), and H Rabie, FCPaed(SA). *S Afr Fam Pract* (2004). 2008 ; 50(2): 6–12.
18. Appropriate use of antibiotics for URIs in children: Part I. Otitis media and acute sinusitis. Dowell SF, Schwartz B, Phillips WR. The Pediatric URI Consensus Team. *Am Fam Physician*. 1998; 58(5):1113–1118. 1123. [PubMed: 9787277]
19. When the Most Potent Combination of Antibiotics Selects for the Greatest Bacterial Load: The Smile-Frown Transition. Rafael Pena-Miller et al. *Plos Biology* April 2013 | Volume 11 | Issue 4 | e1001540
20. On the rapidity of antibiotic resistance evolution facilitated by a concentration gradient. Rutger Hermsen, J. Barrett Deris, and Terence Hwa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 3; 109(27): 10775-10780.
21. Why Is Long-Term Therapy Required to Cure Tuberculosis? Connolly LE, Edelstein PH, Ramakrishnan L. *PLoS Medicine*. 2007;4(3):e120. doi:10.1371/journal.pmed.0040120.
22. Antimicrobial drug development--the past, the present, and the future. Powers JH. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Nov;10 Suppl 4:23-31.
23. Alternating Antibiotics Render Resistant Bacteria Beatable. Lauren Richardson. *Plos Biology* April 8, 2015 DOI: 10.1371/journal.pbio.1002105
24. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Jessica M. A. Blair, Mark A. Webber, Alison J. Baylay, David O. Ogbolu & Laura J. V. Piddock. *Nature Reviews Microbiology* 13, 42–51 (2015) doi:10.1038/nrmicro3380
25. *Frontiers in Antimicrobial Resistance: A Tribute to Stuart B. Levy*. David G. White, Michael N. Alekshun and Patrick F. Mcdermott, Eds. ASM Press, USA, 2005. ISBN 1-55581-329-1.1194
26. Mutation Mechanisms by Daniele Castiglia, Giovanna Zambruno. *Dermatologic Clinics* (2010) Volume: 28, Issue: 1, Pages: 17-22
27. *Modern Genetic Analysis*. Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, et al. New York: W. H. Freeman; 1999.
28. Rates of spontaneous mutation. Drake JW, Charlesworth D, Crow FC. *Genetics*. 1998;148:1667-86
29. El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Aurelio Mendoza Medellín. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. Vol. 54, N.o 1. Enero-Febrero 2011

30. Epigenetic inheritance based evolution of antibiotic resistance in bacteria. Adam M, Murali B, Glenn NO, Potter SS. *BMC Evol Biol.* 2008 Nov. DOI: 10.1186/1471-2148-8-52.
31. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. A Telenti et al. *Lancet* (1993) Volume: 341, Issue: 8846, Pages: 647-650
32. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. Kelli L. Palmer, Veronica N. Kos, Michael S. Gilmore. *Current Opinion in Microbiology* (2010) Volume: 13, Issue: 5, Pages: 632-639
33. Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Veterinary Pathology* 51 (2): 328–340. doi:10.1177/0300985813511131. PMID 24318976.
34. An Introduction to Genetic Analysis, 7th edition Anthony JF Griffiths, Jeffrey H Miller, David T Suzuki, Richard C Lewontin, and William M Gelbart. New York: W. H. Freeman; 2000. SBN-10: 0-7167-3520-2
35. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. R. Mazaheri Nezhad Fard, M. D. Barton, M. W. Heuzenroeder. *Letters in Applied Microbiology* (2011) Volume: 52, Issue: 6, Pages: 559-564
36. Evolution of conjugation and type IV secretion systems. Julien Guglielmini, Fernando De La Cruz, Eduardo P C Rocha. *Molecular Biology and Evolution* (2013) Volume: 30, Issue: 2, Pages: 315-331
37. Mechanisms of antibiotic resistance. Jesus Silva. *Current therapeutic research Vol 57 Supple A* 1996.
38. *Microbiology: An Introduction*, Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case, Skyline College. 2013 ISBN-10: 0321733606 • ISBN-13: 9780321733603
39. Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. M Vaara. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Nov; 37(11): 2255–2260. PMID: 125192375
40. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. Nikaido H. *J Bacteriol.* 1996 Oct;178(20):5853-9.
41. Efflux Mediated Drug Resistance in Bacteria. Xian Zhi Li and Hiroshi Nikaido. *Drugs* 2004; 64 (2) 159-204
42. DNA Uptake during bacterial transformation. Inês Chen and David Dubnau *Nature Reviews, MICROBIOLOGY VOLUME 2, MARCH 2004, 241*
43. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria An update. Li XZ and Nikaido H. *Drugs.* 2009. Volume: 69, Issue: 12, Pages: 1555-1623
44. Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. George AM, Levy SB. *J Bacteriol* 1983, Aug Vol. 155 No. 2 p. 531-540
45. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. Alekshun MN, Levy SB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41(10):2067-2075.
46. The *mar* regulon: Multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. Alekshun MN, Levy SB. *Trends Microbiol.* 1999. 7: 410–413. doi: 10.1016/S0966-842X (99)01589-9.

47. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. Emiko Y. Rosenberg, Dan Bertenthal, Matthew L. Nilles, Kevin P. Bertrand, Hiroshi Nikaido *Molecular Microbiology* (2003). Volume: 48, Issue: 6, Pages: 1609-1619
48. Multidrug resistance in bacteria. Hiroshi Nikaido. *Annual review of biochemistry* (2009) Volume: 78, Pages: 119-146
49. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. Adam C. Palmer and Roy Kishony. *NATURE REVIEWS | GENETICS VOLUME 14 | APRIL 2013 | 243*
50. Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. Sánchez-Romero MA, Casadesús J. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 Jan. doi: 10.1128/CMR.00043-12
51. Epigenetic inheritance based evolution of antibiotic resistance in bacteria. Adam M, Murali B, Glenn NO, Potter SS. *BMC Evol Biol.* 2008 Nov. DOI: 10.1186/1471-2148-8-52.
52. Epigenetic Gene Regulation in the Bacterial World. Casadesús J and Low. *Mol. Biol. Rev.* 2006 Sep, 70(3):830. doi:10.1128/MMBR.00016-06.
53. Roles of DNA Adenine Methylation in Regulating Bacterial Gene Expression and Virulence. David A. Low, Nathan J. Weyand and Michael J. Mahan *Infect. Immun.* 2001, 69(12):7197. DOI: 10.1128/IAI.69.12.7197-7204.2001.
54. Timescales of Genetic and Epigenetic Inheritance. Rando OJ, Verstrepen KJ. *Cell.* 2007; doi: 10.1016/j.cell.2007.01.023.
55. The great GATC: DNA methylation in *E. coli*. Barras F, Marinus MG (1989). *Trends in Genetics* 5: 139–143. doi:10.1016/0168-9525(89)90054-1
56. Dam methylation: coordinating cellular processes. Anders Løbner-Olesen<sup>1</sup>, Ole Skovgaard and Martin G Marinus. *Current Opinion in Microbiology* 2005, 8:154–160
57. Trade-offs between drug toxicity and benefit in the multi-antibiotic resistance system underlie optimal growth of *E. coli*. Wood KB, Cluzel P. *BMC Systems Biology.* 2012. doi: 10.1186/1752-0509-6-48.
58. The MarR repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*: prototypic member of a family of bacterial regulatory proteins involved in sensing phenolic compounds. Sulavik MC, Gambino LF, Miller PF. *Molecular Medicine* 1995; 1(4):436-446.
59. Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. Sánchez-Romero MA, Casadesús J. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 Jan. doi: 10.1128/CMR.00043-12
60. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. Alekshun MN, Levy SB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41(10):2067-2075.
61. Broad Specificity Efflux pumps and Their Role in Multidrug Resistance of Gram Negative Bacteria. Nikaido H, Pagès J-M. *FEMS microbiology reviews* 2012; 36(2):340-363. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00290.x.
62. Characterization of MarR, the Repressor of the Multiple Antibiotic Resistance (*mar*) Operon in *Escherichia coli*. ASUNCION S. SEOANE AND STUART B. LEVY. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, June 1995, p. 3414–3419 Vol. 177, No. 12

63. Autoactivation of the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. Martin RG, Jair KW, Wolf RE, Rosner JL. *Journal of Bacteriology* 1996; 178 (8):2216–2223. PMID: 8636021
64. The *mar* regulon: Multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. Alekshun MN, Levy SB. *Trends Microbiol.* 1999. 7: 410–413. PMID: 10498949
65. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. Ma, D. Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H.; Hearst, J.E. *Mol. Microbiol.* 1996, 19, 101–112.
66. Role of SeqA and Dam in *Escherichia coli* gene expression: A global microarray analysis. Anders Løbner-Olesen, Martin G. Marinus, and Flemming G. Hansen.
67. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. Emiko Y. Rosenberg, Dan Bertenthal, Matthew L. Nilles, Kevin P. Bertrand and Hiroshi Nikaido. *Molecular Microbiology* (2003) 48 (6), 1609–1619 doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03531.x
68. Alteration of the Repressor Activity of MarR, the Negative Regulator of the *Escherichia coli* *marRAB* Locus, by Multiple Chemicals In Vitro. Alekshun MN, Levy SB. *Journal of Bacteriology* 1999; 181 (15):4669–4672. PMID: 10419969
69. Autoactivation of the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. Martin RG, Jair KW, Wolf RE, Rosner JL. *Journal of Bacteriology* 1996; 178 (8):2216–2223. PMID: 8636021
70. Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons. *Mol. Microbiol.* 51:1801–1816. Griffith, K. L., I. M. Shah, and R. E. Wolf, Jr. 2004.
71. AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux complex. Tikhonova EB, Zgurskaya HI. 2004. *J Biol Chem.* 279:32116–32124.
72. Characterization of an *Escherichia coli* O157:H7 *marR* mutant. Sima Yarona, David G. Whiteb, Karl R. Matthews, \**International Journal of Food Microbiology* 85 (2003) 281–291
73. Overexpression of the *marA* or *soxS* Regulatory Gene in Clinical Topoisomerase Mutants of *Escherichia coli*. Margret Oethinger, Isabelle Podglajec, Winfried V. Kern, and Stuart B. Levy. *Antimicrob. Agents Chemother.* August 1998 vol. 42 no. 8 2089-2094
74. An Excretory Function for the *Escherichia coli* Outer Membrane Pore TolC: Upregulation of *marA* and *soxS* Transcription and Rob Activity Due to Metabolites Accumulated in *tolC* Mutants. Rosner JL, Martin RG. *Journal of Bacteriology* 2009; 191(16):5283-5292. doi:10.1128/JB.00507-09.
75. Morphological and Physiological Changes Induced by High Hydrostatic Pressure in Exponential- and Stationary-Phase Cells of *Escherichia coli*: Relationship with Cell Death. Pilar Mañas and Bernard M. Mackey. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Mar. 2004, p. 1545–1554 Vol. 70, No. 3

76. Stationary phase in gram-negative bacteria. Juana María Navarro Llorens, Antonio Tormo & Esteban Martínez-García. *FEMS Microbiol Rev* 34 (2010) 476–495
77. Polarity and Differential Inheritance—Universal Attributes of Life? Ian G. Macara and Stavroula Mili. *Cell* 135, November 28, 2008 ©2008 Elsevier Inc.
78. Andersson DI, Hughes D. (2011) Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol Rev* 35(5):901-11.
79. CONTINUOUS ANTIBIOTIC INFUSIONS, Johns Hopkins Hospital Antimicrobial Stewardship Program, 2010.  
[http://www.hopkinsmedicine.org/amp/includes/Continuous\\_and\\_Extended\\_Infusion\\_Beta\\_lactams.pdf](http://www.hopkinsmedicine.org/amp/includes/Continuous_and_Extended_Infusion_Beta_lactams.pdf)
80. CONTINUOUS ANTIBIOTIC INFUSIONS, Official website of the Orlando Health Surgical Critical Care and Acute Care Surgery Fellowships.  
[http://www.surgicalcriticalcare.net/Guidelines/continuous\\_antibiotic\\_infusions.pdf](http://www.surgicalcriticalcare.net/Guidelines/continuous_antibiotic_infusions.pdf)