



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“COMPARACIÓN INICIAL DE LOS RESISTOMAS OCULAR  
Y RECTAL-ANAL DE INDIVIDUOS JÓVENES  
ASINTOMÁTICOS.”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**VÍCTOR HUGO PÉREZ CARRILLO**

**Ciudad.Universitaria,.CDMX**

**2017**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE  
**VOCAL:** EDUARDO BONILLA ESPINOSA  
**SECRETARIO:** MARCO ANTONIO ORTIZ JIMÉNEZ  
**1er. SUPLENTE:** NORMA ANGÉLICA CASTELLANOS CHÁVEZ  
**2° SUPLENTE:** ANA LILIA CRUCES MARTÍNEZ

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR.  
ANEXO LABORATORIO 1- A. FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

**ASESOR DEL TEMA:** DR. JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

\_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:** VÍCTOR HUGO PÉREZ CARRILLO

\_\_\_\_\_

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>ANTIBIÓTICOS</b>	<b>5</b>
INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PARED CELULAR.	7
BLOQUEO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA.	8
ALTERACIÓN DE LA MEMBRANA CITOPASMÁTICA.	8
INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.	9
ALTERACIÓN EN EL METABOLISMO O ESTRUCTURA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS.	10
BLOQUEO DE LA SÍNTESIS DE FOLATO.	11
<b>RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS</b>	<b>13</b>
TRANSFORMACIÓN:	15
TRANSDUCCIÓN:	15
CONJUGACIÓN:	16
PLÁSMIDOS.	17
TRANSPOSONES.	17
INTEGRONES.	19
<b>MECANISMOS DE RESISTENCIA.</b>	<b>20</b>
MODIFICACIÓN DEL BLANCO DEL ANTIBIÓTICO POR PROCESOS DE MUTACIÓN O PROCESOS POST-TRADUCCIONALES.	21
INACTIVACIÓN DEL ANTIBIÓTICO POR HIDRÓLISIS O MODIFICACIÓN DE SU ESTRUCTURA.	22
BOMBAS DE EXPULSIÓN.	23
<b>RESISTOMA.</b>	<b>27</b>
<b>MICROBIOMA HUMANO.</b>	<b>28</b>
<b>OBJETIVO GENERAL:</b>	<b>30</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES:</b>	<b>30</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>31</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>32</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>39</b>
<b>PRUEBAS BIOQUÍMICAS</b>	<b>39</b>
<b>RÉPLICA EN PLACA (RÉPLICA PLATING).</b>	<b>41</b>
<b>CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS PARA LOS ANTIBIOGRAMAS.</b>	<b>43</b>
<b>PRUEBA DE TOLERANCIA AL BROMURO DE ETIDIO.</b>	<b>44</b>
<b>ENSAYO ESPECTROFLUOROMÉTRICO PARA EL ANÁLISIS DE LA SOBRE EXPRESIÓN DE BOMBAS DE EXPULSIÓN.</b>	<b>46</b>
<b>ANTIBIOGRAMA (MÉTODO DE KIRBY – BAUER) PARA BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.</b>	<b>48</b>
<b>ANTIBIOGRAMA (MÉTODO DE KIRBY – BAUER) PARA BACTERIAS GRAM POSITIVAS.</b>	<b>49</b>
<b>EXTRACCIÓN DE DNA Y ESTUDIO DE LOS GENES <i>ACR<sup>B</sup></i>, <i>MAR<sup>A</sup></i> Y <i>NOR<sup>A</sup></i> MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO I.</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO II.</b>	<b>71</b>
<b>REFERENCIAS.</b>	<b>75</b>

## RESUMEN

La multirresistencia a los antibióticos por parte de las bacterias ha tomado gran importancia en las últimas décadas debido a los problemas de salud que estas provocan. Debido a esto se han identificado diferentes mecanismos de resistencia en las bacterias entre los que destacan las bombas de expulsión, sistemas de transporte membranal frecuentemente de tipo secundario acoplado al gradiente de protones en los procariontes.

Se cree que compuestos químicos tales como el 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) y el omeprazol (que alteran el gradiente quimio-osmótico de la célula) pueden inhibir a las bombas de expulsión, las cuales normalmente participan en la detoxificación de las células. En el presente trabajo se identificaron y purificaron bacterias multirresistentes a antibióticos provenientes de dos regiones corporales muy diferentes entre sí: la conjuntiva ocular y el esfínter anal. De las bacterias cultivadas procedentes de dichos hábitats se aislaron aquellas que mostraron una posible sobre expresión de bombas de expulsión mediante una prueba de tolerancia al bromuro de etidio y un ensayo espectrofluorométrico; para determinar la multirresistencia a los antibióticos se realizó el método de Kirby Bauer.

Posteriormente se probó el efecto del 2,4-DNP y del omeprazol y se observó la relación que existe entre el fenotipo de multirresistencia y estos compuestos en el crecimiento de la bacteria. Finalmente se realizó un estudio de los genes *acrB*, *marA* y *norA* mediante la técnica de PCR.

El efecto de los desacoplantes del gradiente quimio-osmótico resultó ser muy complejo, lo cual muestra que su presencia alteró a la fisiología celular en

múltiples puntos, posiblemente a través de los regulones *mar* y *mgr* para bacterias Gram negativas y positivas respectivamente.

Además se sugiere que ocurre el fenómeno de duplicación y amplificación génica para los genes estudiados mediante PCR para bacterias Gram negativas mientras que en las bacterias Gram positivas parece no presentarse.

Se concluye que a pesar de provenir de sitios anatómicos tan diferentes, en los mismos se encuentran bacterias multirresistentes a los antibióticos que posiblemente presentan sobre expresión de bombas de expulsión. De cualquier manera parece ser que existe una mayor proporción de bacterias resistentes a antibióticos en las muestras tomadas de la región recto-anal.

## INTRODUCCIÓN

### Antecedentes:

Desde el origen de la humanidad, esta ha tenido que enfrentar diferentes retos para lograr su supervivencia, dentro de los que principalmente destacan las infecciones causadas por todo tipo de microorganismos patógenos y oportunistas tales como virus, parásitos y bacterias. A lo largo del desarrollo de todas las culturas a través de la historia, estas fueron generando prácticas las cuales les permitían luchar contra las infecciones que los microorganismos provocaban ya sea consumiendo alimentos que contenían compuestos antimicrobianos o utilizando directamente remedios conocidos para combatir las infecciones. Esto se ha demostrado al encontrarse huesos que datan de la época de los romanos en los cuales se ha hallado tetraciclina (Cook *et al.*, 2009) que se une a la hidroxiapatita, un mineral de los huesos permitiendo la caracterización de este antimicrobiano y llegando a la creencia que se tuvo que estar expuesto a una fuente de tetraciclina o consumir alimentos que la contuvieran. En Jordania se ha transmitido a través de las generaciones que el uso de suelos rojos tiene propiedades en el tratamiento de infecciones de la piel. Ahora sabemos que en esos suelos existen bacterias que producen antibióticos (Falkinham *et al.*, 2009) capaces de combatir dichas infecciones. Y el mayor ejemplo que se sigue conservando hasta ahora es la medicina tradicional china en la cual se usan diferentes remedios para combatir todo tipo de infecciones utilizando los conocimientos ancestrales del uso de plantas y animales (Aminov, R. I. *et al.* 2010).

Con el paso del tiempo se comenzaron a utilizar diferentes compuestos para combatir las infecciones, aunque en algunos casos “el remedio era peor que la enfermedad”, tal fue el caso de la sífilis, una enfermedad de transmisión sexual, en la cual se usaban sales de mercurio para combatirla (Aminov, R. I. *et al.* 2010).

Muchos grandes personajes en la ciencia estuvieron interesados en estudiar a los microorganismos y cómo contrarrestarlos. Tal fue el caso de Luis Pasteur y de Robert Koch, entre otros. Sin embargo no fue sino hasta la “era del antibiótico” encabezada por Paul Ehrlich, descubridor del Salvarsán, un compuesto orgánico con núcleo de arsénico el cual actuaba en contra de la sífilis y Alexander Fleming descubridor del primer antibiótico; la penicilina, antibiótico beta-lactámico que relevó al Salvarsán en contra de la sífilis y usado para otros tipos de infecciones.

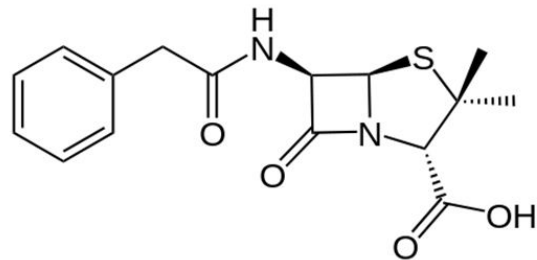
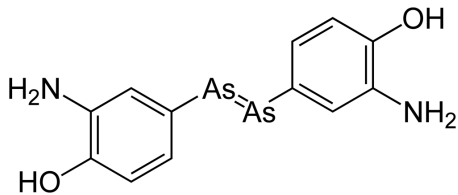


Figura 1. Estructura química del salvarsán.      Figura 2. Estructura química de la penicilina.

No obstante, Alexander Fleming advirtió que el uso desmesurado de sustancias químicas como tratamiento contra infecciones tendría repercusiones graves en la salud humana. Aun así, se comenzó la investigación, desarrollo y producción excesiva de antibióticos.



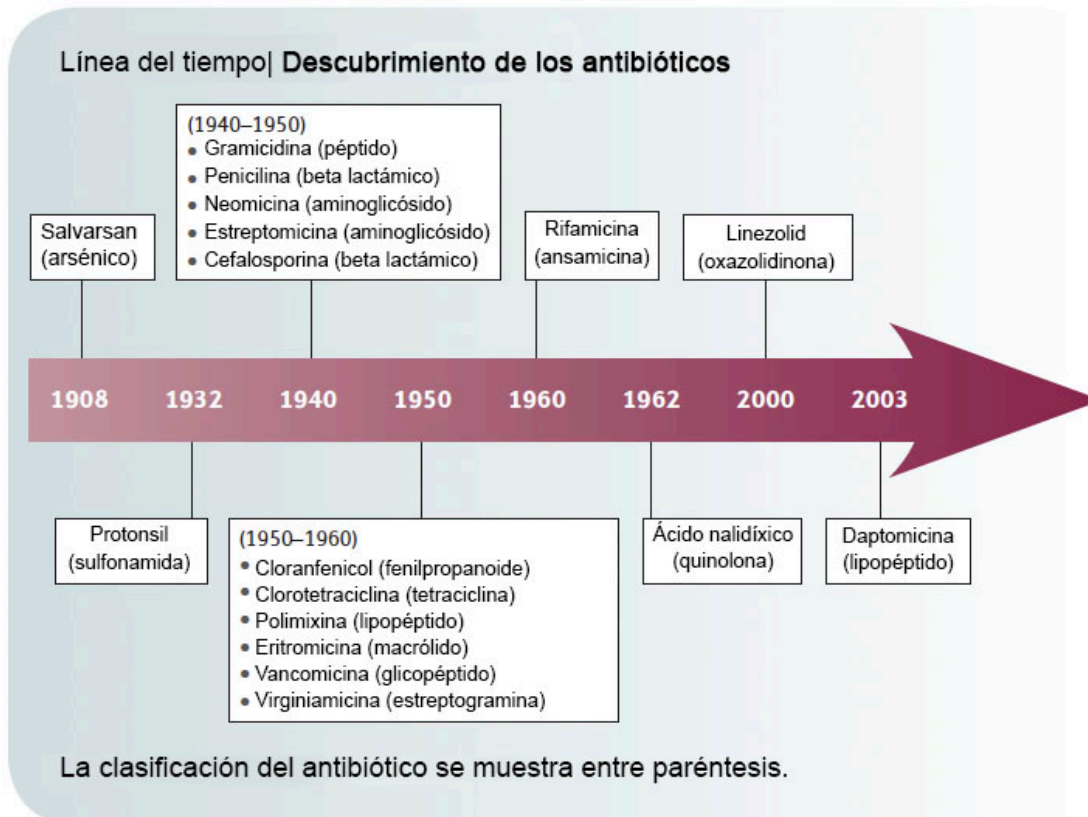


Figura 3. Línea del tiempo del desarrollo de diferentes antibióticos. Tomado de Wright, G. D. 2007.

## Antibióticos

Un antibiótico se define como una sustancia de origen natural o sintético que inhibe el crecimiento de ciertos microorganismos susceptibles, utilizado principalmente en bacterias, ya sea matándolas (bactericida) o simplemente deteniendo su crecimiento por un determinado periodo de tiempo (bacteriostático) (Patiño, D. 2003 y Calvo, J & Martínez-Martínez, L. 2009)

Se puede medir su efecto en términos del espectro; amplio espectro (actúan en contra de un número considerable de especies bacterias), espectro limitado (actúan contra un número reducido de especies bacterias), además en ocasiones se suele mencionar que existe un espectro selectivo (el cual actúa en contra de ciertas especies bacterianas con características específicas).

Para que los antibióticos ejerzan su efecto sobre las bacterias, estos deben tener contacto directo con alguna estructura celular de éstas. Por ello, los antibióticos pueden ser clasificados basándose en el componente celular que pueden afectar o alterar (Calvo et al, 2009):

- Inhibición de la síntesis de pared celular.
- Bloqueo de los mecanismos de resistencia
- Alteración de la membrana citoplasmática.
- Inhibición de la síntesis de proteínas.
- Alteración en el metabolismo o estructura de los ácidos nucleicos.
- Bloqueo de la síntesis de folato.

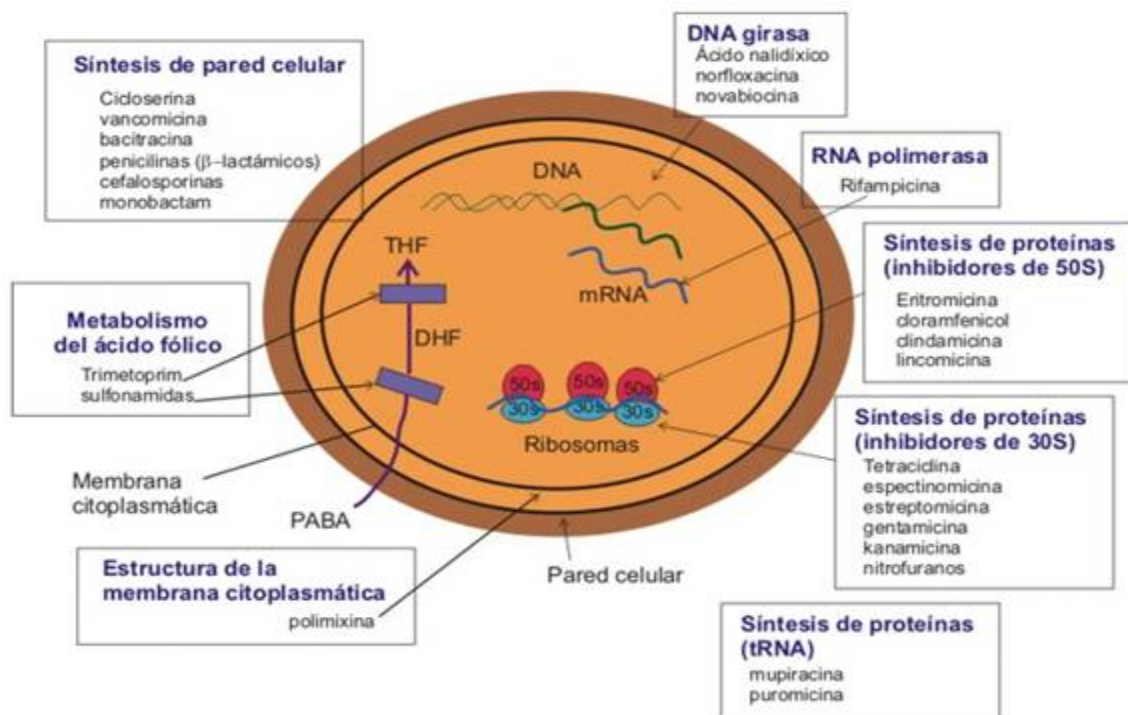


Figura 4. Representación esquemática de los mecanismo de acción de los antibióticos sobre sus dianas. Tomada de Madigan, M. T. *et al.* 2009.

## Inhibición de la síntesis de pared celular.

La pared celular bacteriana es una estructura especializada compuesta de peptidoglicano que ayuda al mantenimiento de la célula dándole cierta rigidez para soportar la diferencia de gradientes osmóticos en el medio además de proporcionar la morfología de estas. La síntesis de esta se lleva a cabo en 3 etapas: la fase citoplásmica, la fase sintética de precursores del peptidoglicano y la fase de organización. Los antibióticos pertenecientes a este grupo inhiben la síntesis de peptidoglicano en cualquiera de las tres fases anteriormente mencionadas provocando así la lisis bacteriana. Estos son principalmente más activos contra las bacterias Gram positivas, debido a que estas presentan una mayor cantidad de peptidoglicano. Cabe destacar que estos antibióticos son poco tóxicos con la célula humana debido a su carencia de pared celular. Por lo tanto, son moléculas especializadas en contra de las bacterias. Uno de los antibióticos más representativos de este grupo es la penicilina.

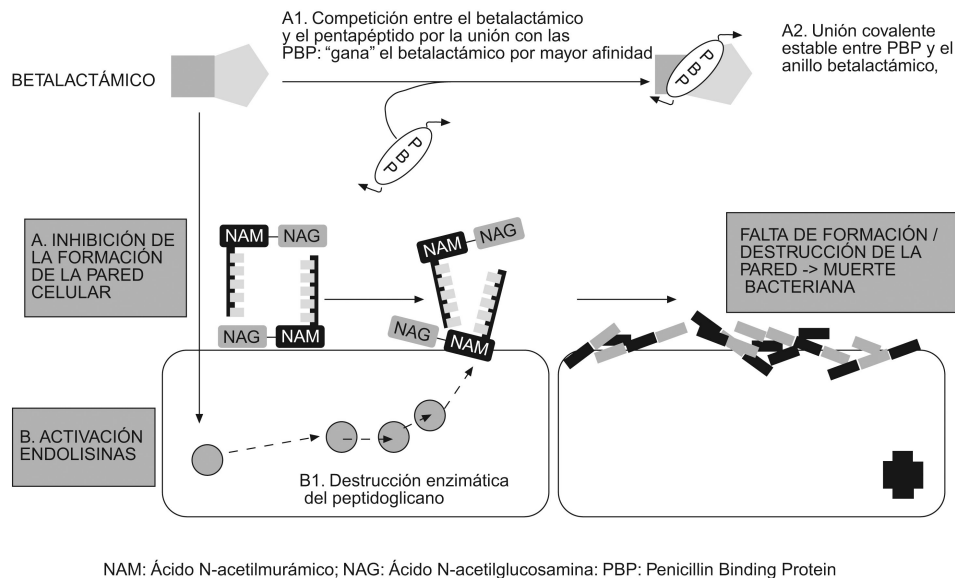


Figura 5. Mecanismo de acción de los antibióticos que atacan la pared celular bacteriana. Tomado de Suárez C. y Gudiol, F. 2009.

### Bloqueo de los mecanismos de resistencia.

Este tipo de mecanismo no tiene *per se* una acción terapéutica. Sin embargo, se utiliza como adyuvante con los antibióticos para potencializar su efecto o evitar que estos pierdan su capacidad biocida. Dentro de los más importantes se encuentran los inhibidores de las beta-lactamasas como el ácido clavulánico y el sulbactam.

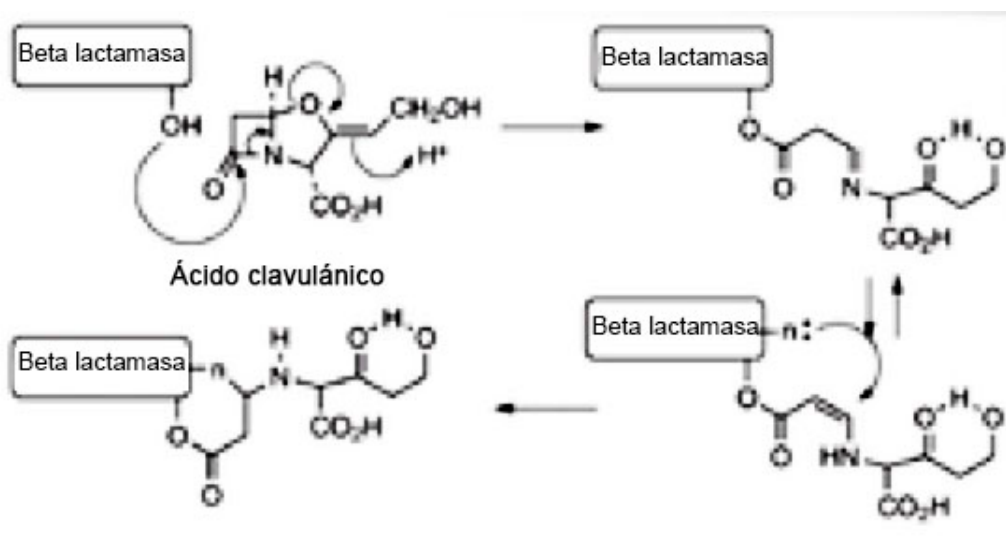


Figura 6. Mecanismo de acción del ácido clavulánico sobre la beta-lactamasa

### Alteración de la membrana citoplasmática.

Debido a la importancia vital de la membrana citoplasmática y su control en los procesos de transporte dentro y fuera de la célula, estos antibióticos actúan modificando la permeabilidad, provocando así la salida de compuestos vitales para la supervivencia tales como el ion potasio o sodio, así como dejando entrar otros compuestos que pueden alterar el metabolismo bacteriano provocando su muerte. Estos antibióticos pueden llegar a ser tóxicos para el ser humano ya que podrían actuar también sobre la membrana citoplasmática eucarionte. Dentro de este grupo se encuentran las polimixinas, los ionóforos y los formadores de poros.

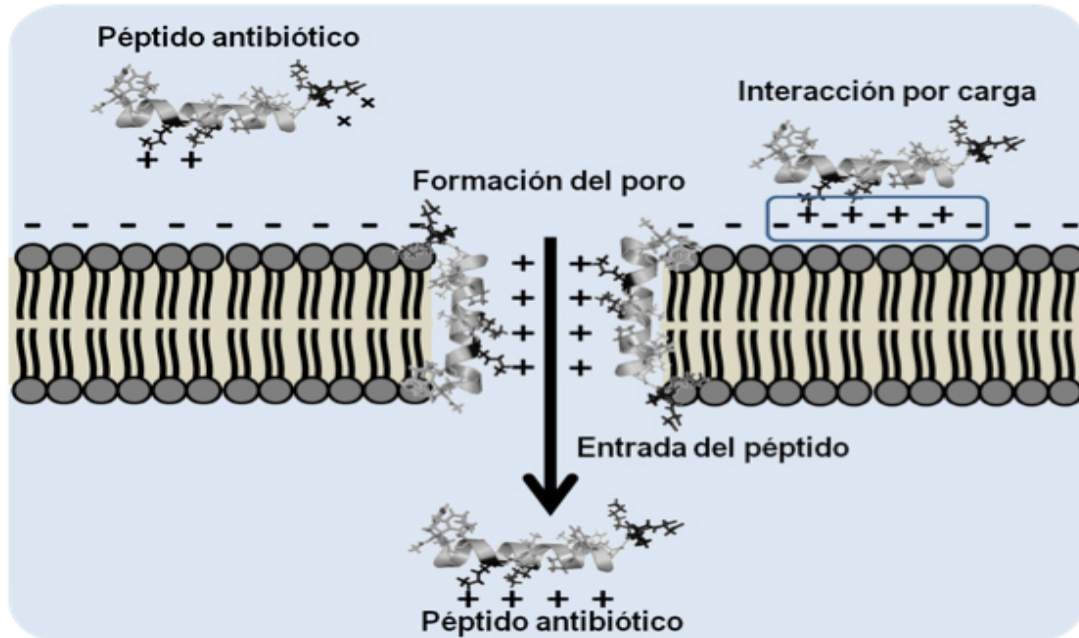


Figura 7. Mecanismo de acción de los antibióticos que alteran la membrana citoplasmica.

### **Inhibición de la síntesis de proteínas.**

La síntesis de proteínas es un proceso universal el cual se lleva a cabo en los ribosomas de todas las células, compuesto por cuatro fases: la fase de activación, fase de síntesis proteica, la fase de fijación del aminoacil-ARNt al ribosoma y la fase de elongación. Sin embargo existen diferencias entre los ribosomas de los eucariontes y procariontes que permiten atacar específicamente a los ribosomas procariontes siendo más selectivos los antimicrobianos. Por lo tanto, es uno de los procesos más afectados por el uso de los antibióticos. Dentro de este grupo de antibióticos se encuentran la tetraciclina, el cloranfenicol y la kanamicina, entre otros.

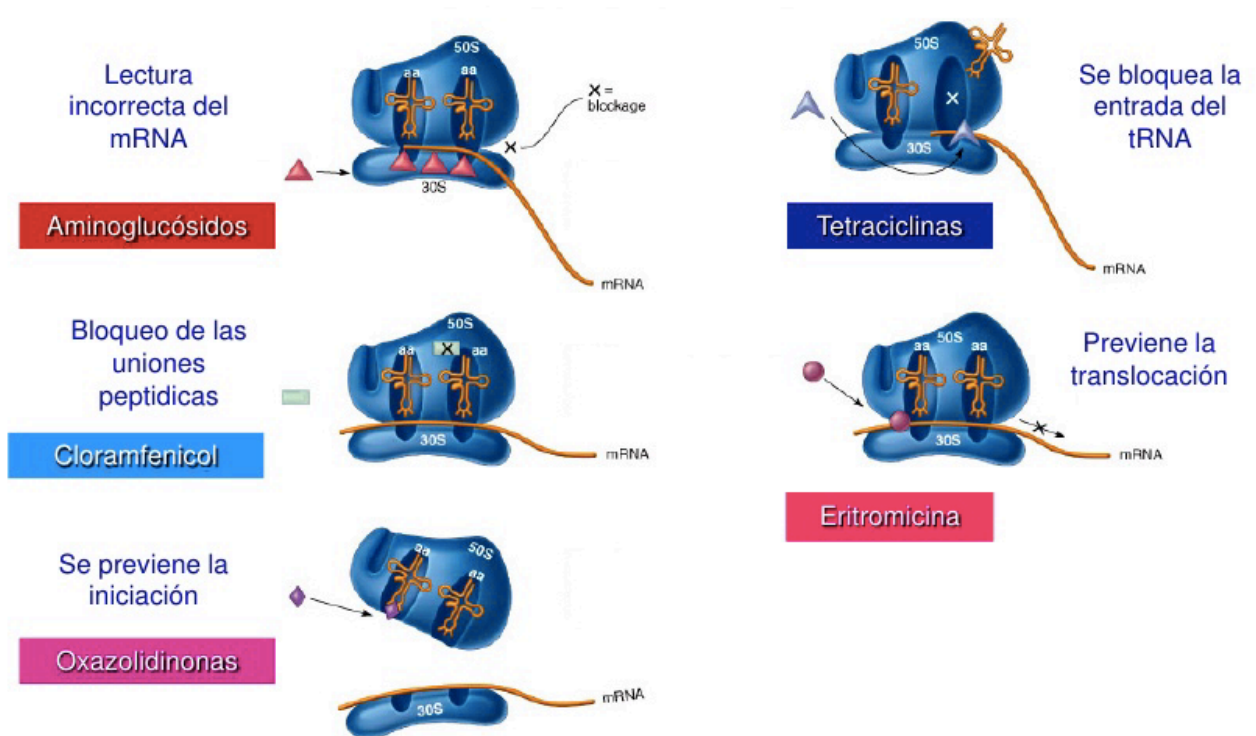


Figura 8. Mecanismo de acción de los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas.

### Alteración en el metabolismo o estructura de los ácidos nucleicos.

La función de los ácidos nucleicos es esencial para el correcto funcionamiento y estabilidad de las células, ya que estos permiten transmitir la información que se encuentra codificada en ellos mediante procesos como duplicación y transcripción. Este grupo de antibióticos puede atacar a las enzimas que intervienen en dichos procesos o directamente sobre los ácidos nucleicos. Podemos encontrar a los que atacan al DNA como es el ejemplo de las quinolonas, nitroimidazoles y nitrofuranos y los que atacan el RNA como son las rifampicinas. Este grupo de antibióticos no es específico para las bacterias y puede presentar cierta actividad principalmente en contra del RNA de las células eucariontes. Sin embargo, el que

las células eucariontes contengan una membrana nuclear hacer más difícil que estos antimicrobianos entren en contacto con el DNA.

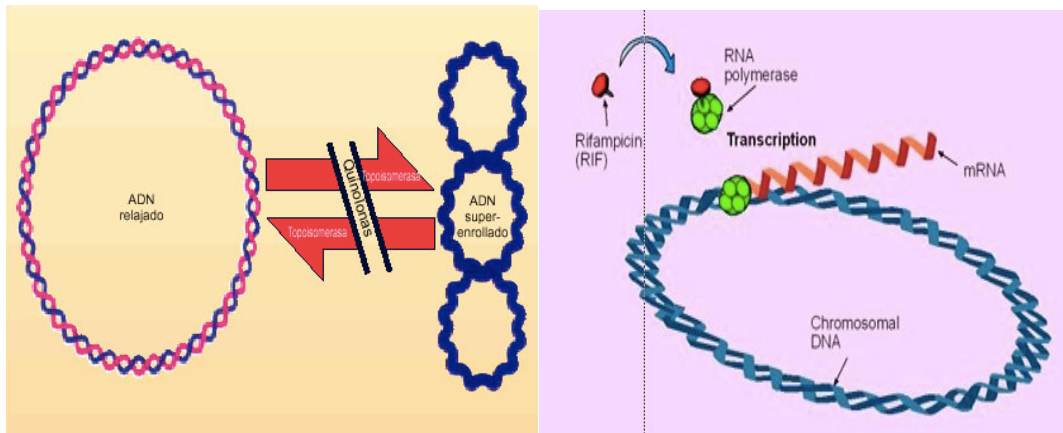


Figura 9. Mecanismo de acción de antibióticos sobre la estructura de los ácidos nucleicos.

### **Bloqueo de la síntesis de folato.**

La síntesis de folatos es importante para la producción de otros compuestos esenciales tales como las bases nitrogenadas y algunos aminoácidos. Este grupo de antibióticos actúa inhibiendo la síntesis de folatos ya que algunas bacterias a diferencia de las eucariontes que lo obtienen de la dieta, no pueden obtener estos compuestos del medio. Por eso estos antibióticos son particularmente específicos contra bacterias. Algunos ejemplos de este grupo de antibióticos son las sulfamidas y las diaminopiridinas.

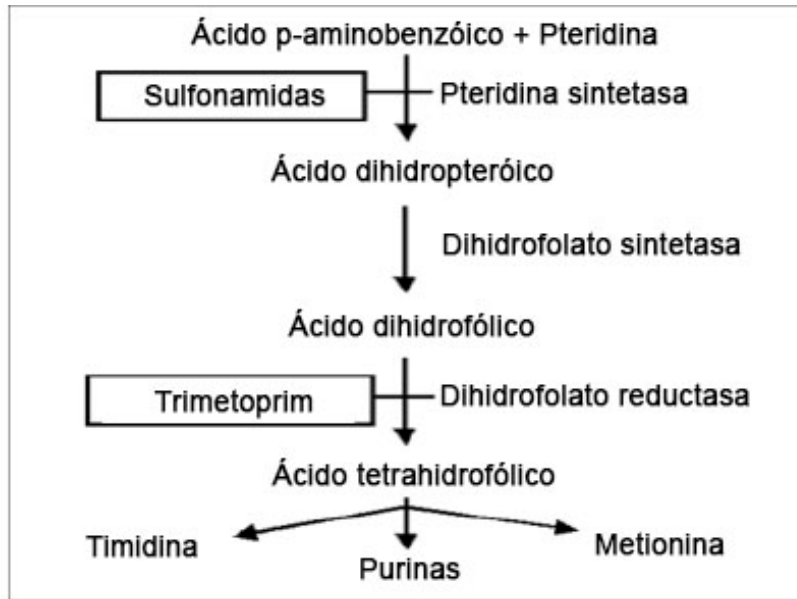


Figura 10. Mecanismo de acción del bloqueo en la síntesis de folato.

Mecanismo de acción	Grupos		Antimicrobianos representativos
Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	β-lactámicos	Penicilinas	Naturales: penicilina G, penicilina V Resistentes a penicilinasas: doxacilina, oxacilina, meticilina Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina Ureidopenicilinas: piperacilina, mezlocilina
		Cefalosporinas	1.ª generación: cefazolina, cefalotina 2.ª generación: cefuroxima, cefoxitina <sup>a</sup> , cefotetán <sup>a</sup> , cefaclor, cefamandol 3.ª generación: cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima 4.ª generación: cefepima, ceftipiro
		Monobactams Carbapenems	Aztreonam Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem Vancomicina, teicoplanina Bacitracina Cidoseerina Fosfomicina
Alteración de la membrana citoplásmica	Glucopéptidos Bacitracina Isoxazolidinonas Fosfonopéptidos Polimixinas Lipopéptidos Ionóforos Formadores poros		Polimixina B, polimixina E (colistina) Daptomicina Tirocidinas Gramicidinas
		Acido fusídico	Acido fusídico
Inhibición de la síntesis proteica	Aminoglucósidos Anfenicoles Estreptograminas Lincosamidas Macrólidos		Gentamicina, tobramicina, ampicina, netilmicina Cloranfenicol, Tiamfenicol Quinupristina-Dalfopristina Clindamicina, lincomicina
		14 átomos carbono: entromicina, clantromicina, roxitromicina 15 átomos carbono: azitromicina (azálidos) 16 átomos carbono: espiramicina, josamicina, midecamicina Cetólidos: telitromicina Mupirocina Linezolid	
Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos	Mupirocina Oxazolidinonas Tetraciclina Glicilicinas Quinolonas		Tetraciclina, doxiciclina, minociclina Tigeciclina
			1.ª generación: ácido nalidíxico, ácido pipemídico 2.ª generación: norfloxacino 3.ª generación: ciprofloxacino, levofloxacino 4.ª generación: moxifloxacino, gemifloxacino
Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos	Rifamicinas Nitroimidazoles Nitrofuranos	Trimetoprima sulfametoxazol	Rifampicina Metronidazol, omidazol, tinidazol Nitrofurantoina, furazolidona Cotrimoxazol
Inhibidores de β-lactamasas	Sulfonamidas, Diaminopirimidinas	Acido clavulánico, sulbactam, tazobactam	

Figura 11. Mecanismo de acción de los antibióticos, sus grupos y sus elementos más representativos. Tomada de Calvo, J & Martínez-Martínez, L. 2009.



## **Resistencia a los antibióticos**

Desde el descubrimiento de la penicilina, A. Fleming en su discurso al obtener el premio Nobel, advirtió de las consecuencias que tendrían los antimicrobianos con un uso excesivo o inadecuado: la resistencia por parte de los microorganismos.

La resistencia a antibióticos por parte de bacterias se puede definir como la capacidad que tiene una bacteria para evadir, metabolizar, inactivar o expulsar de sí misma un antibiótico para asegurar así su supervivencia. Así mismo, la multiresistencia a los antibióticos se puede definir como la capacidad que tiene una bacteria para evadir, metabolizar, inactivar o expulsar de sí misma dos o más antibióticos, para asegurar así su supervivencia.

Con el paso del tiempo se generó una fuerte presión selectiva hacia las bacterias pues además de ser utilizados como un método de tratamiento contra infecciones bacterianas hasta nuestros días, los antibióticos también se han utilizado de manera desmesurada en la ganadería, acuicultura y agricultura como factores de crecimiento para los animales así como para evitar las enfermedades que estos mismos pudieran adquirir, propiciando de esta manera el surgimiento de bacterias capaces de resistir la acción de los antibióticos. Tal es el caso de *Salmonella* Thyphimurium encontrada en corrales ganaderos británicos en 1963 (Khachatourians *et al*, 1998) o la aparición del *Staphylococcus aureus* resistente a metilcilina (French *et al* 2010) llevando a una preocupación de la población en general, pues las bacterias eran más difíciles de tratar y cada vez se necesitaban nuevos antibióticos para lidiar con estas.

Además, actualmente existe una preocupación muy grande ya que solo en Europa aproximadamente 25,000 personas mueren cada año por infecciones debido a

bacterias multirresistentes a antibióticos (Walker, D. & Fowler, 2011). Por otra parte, en los Estados Unidos más de 2 millones de personas sufren anualmente infecciones con bacterias multirresistentes a antibióticos y, de estas, 23,000 personas mueren como resultado directo (World Health Organization, 2014 & Hampton, T. 2013).

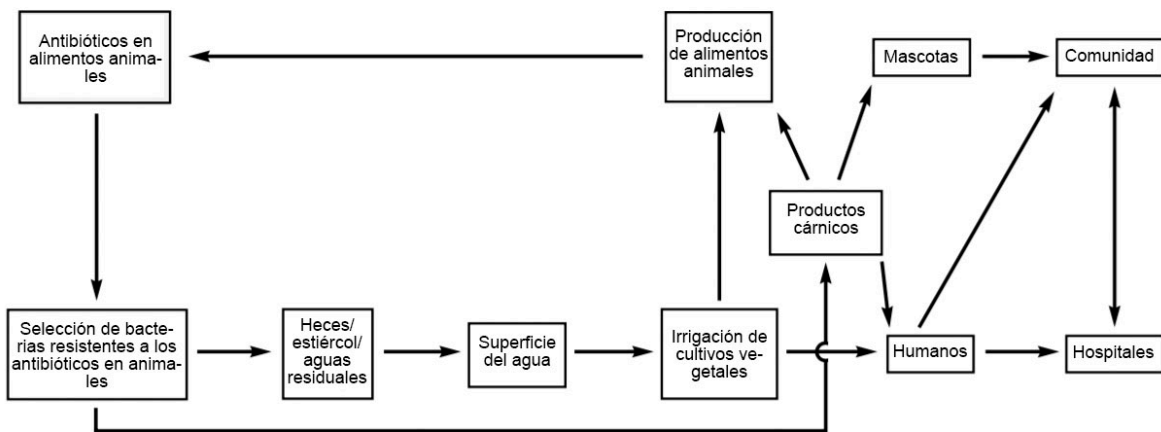


Figura 12. Formas en las que se puede seleccionar y transmitir bacterias resistentes a los antibióticos a través de la agricultura. Tomada de Khachatourians, G. G. 1998.

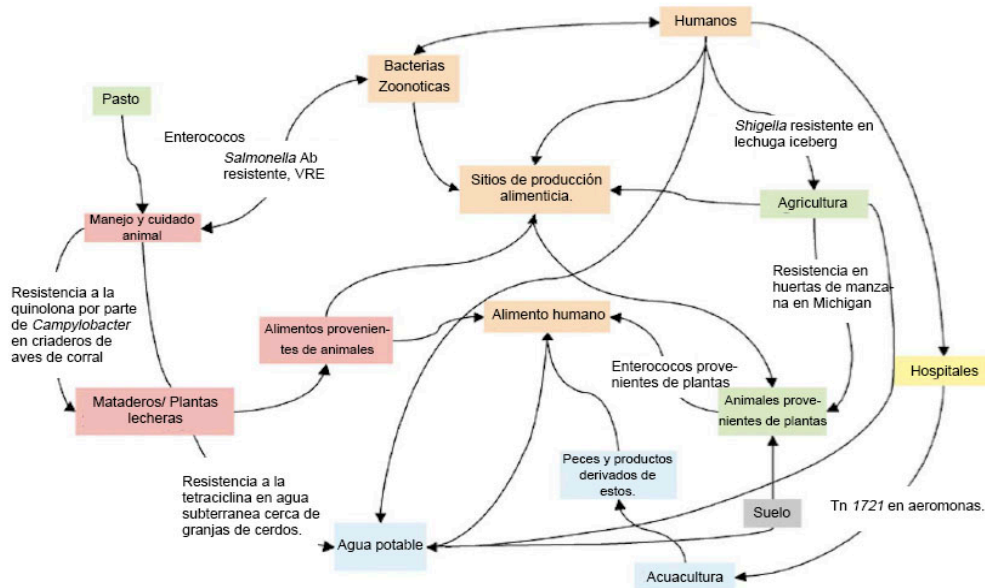


Figura 13. Imagen que esquematiza como se adquiere la resistencia a los antibióticos. Tomada de Sørum, H. et al. 2002.

Para que una bacteria se considere resistente a uno o más antibióticos necesita tener forzosamente contacto con estos y presentar mutaciones que le permitan adaptarse y sobrevivir (trasferencia vertical de genes) o algún mecanismo de defensa o resistencia, los cuales principalmente se obtienen por adquisición de genes (trasferencia horizontal) a través de:

### **Transformación:**

Proceso por el cual una bacteria competente adquiere fragmentos de DNA de otra bacteria libre en el ambiente, adicionándolos a su genoma y ocasionando que ésta presente mecanismos o capacidades que antes de adicionar el DNA exógeno al suyo no poseía. Este mecanismo ocurre naturalmente tanto en bacterias Gram negativas como positivas.

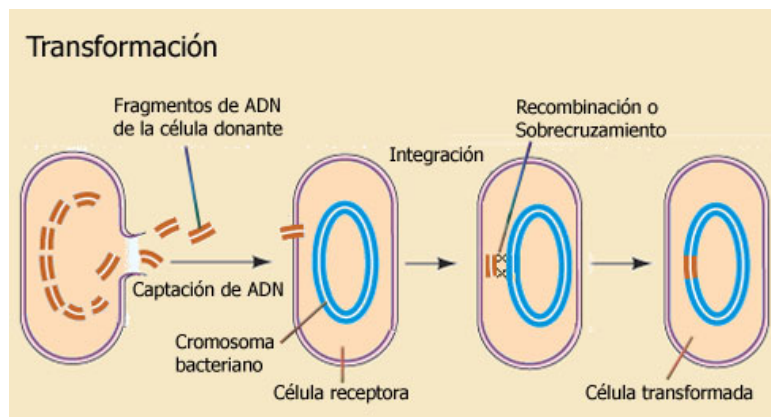


Figura 14. Mecanismo de transformación genética.

### **Transducción:**

Proceso mediante el cual un vector viral transfiere material genético de una bacteria a otra. Este proceso puede ser generalizado o especializado. Durante el proceso de infección del virus dentro de la bacteria, se forman subproductos anómalos llamados partículas transductoras, las cuales pueden ser fragmentos de DNA

genómico de la bacteria infectada únicamente o fragmentos del vector viral y la bacteria infectada, guardados dentro de las cápsides de los virus. Posteriormente, al liberarse los virus que contengan partículas trasductoras infectaran normalmente a otras células, en donde el material genético que ingresa se recombinará y expresará su información dentro del nuevo hospedero (Griffiths, A. J. *et al* 2008).

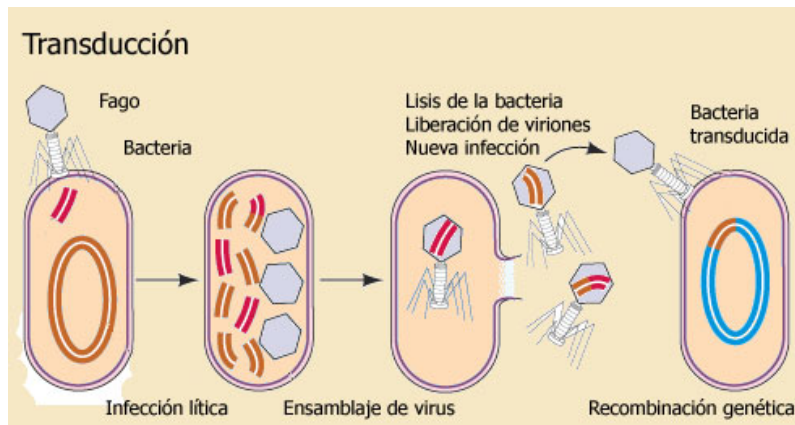


Figura 15. Proceso de transducción genética

**Conjugación:**

La conjugación es el proceso por el cual una célula donadora transfiere parte de su material genético a una célula receptora con la que debe de haber un contacto directo.

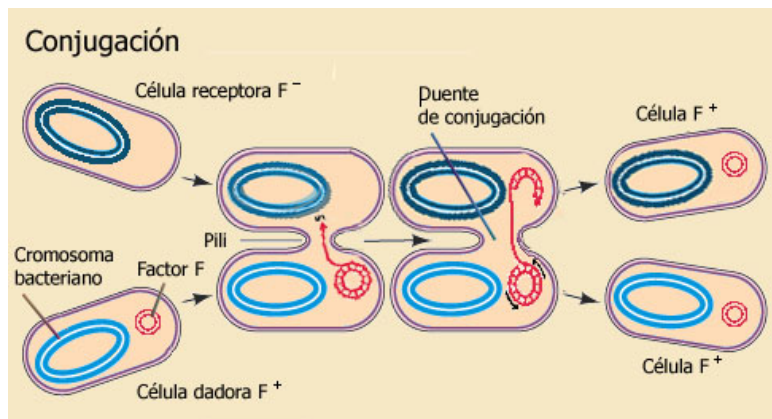


Figura 16. Proceso de conjugación genética.

Dentro de los elementos genéticos que más frecuentemente codifican para resistencia a los antibióticos podemos encontrar:

### Plásmidos.

Los plásmidos son DNA extra cromosómico circular cerrado con una conformación de doble hélice al igual que el DNA cromosomal y pueden replicarse independientemente del DNA cromosomal del hospedero. Se encuentran presentes en bacterias y contienen uno o más genes que las proveen de ventajas para su desarrollo en un ambiente determinado entre los que se encuentran la resistencia a los antibióticos. Existen plásmidos integrativos, los cuales se insertan al cromosoma del hospedero dando como resultados bacterias Hfr. Una vez insertado el plásmido dentro del cromosoma, se le denomina episoma (Griffiths, A. J. *et al* 2008).

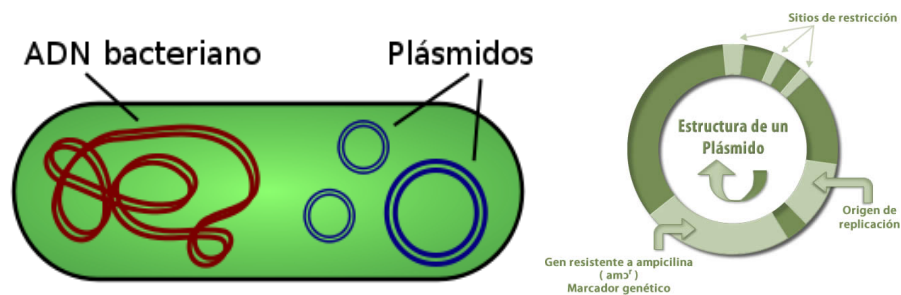


Figura 17. Esquema de un plásmido (lado izquierdo: comparación entre el DNA cromosomal y un plásmido, lado derecho: esquema de un plásmido).

### Transposones.

Los transposones son fragmentos de DNA que tienen la capacidad de moverse a través del genoma desde un locus a otro dentro de un mismo organismo, del genoma de un organismo a otro y también del genoma de un organismo a un

plásmido y viceversa. Debido a esta capacidad, los transposones, pueden inactivar o activar genes. Aun no se conoce cuál es el mecanismo específico, si es que existe, de cómo este elemento reconoce las secuencias en las cuales podrá insertarse desde un donador a un receptor (Griffiths, A. J. *et al* 2008).

La estructura general de un transposón está compuesta por dos secuencias IR repetidas de forma inversa en sus extremos que forman lo que se denomina una repetición invertida (del inglés *inverted repeat*.), una secuencia que codifica para la enzima transposasa necesaria para que este elemento pueda llevar a cabo su movilidad y otra secuencia que por lo regular codifica para un gen de resistencia para algún antimicrobiano. Estos pueden ser simples o compuestos y tener dos formas de transposición, ya sea replicativa o conservativa (Griffiths, A. J. *et al* 2008).

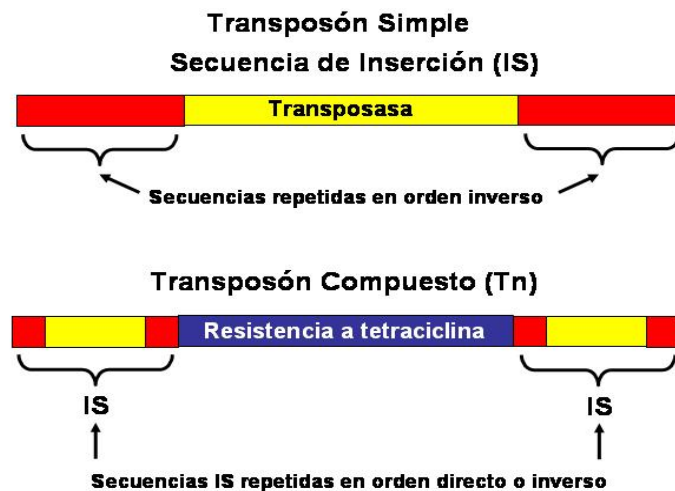


Figura 18. Esquema de un transposón simple y compuesto.

## **Integrones.**

Los integrones son elementos que cuentan con un mecanismo de recombinación sitio-específica. En décadas recientes, estos elementos han tomado un papel importante en la resistencia a los antibióticos.

Los integrones, en su forma más sencilla, están formados por 3 elementos necesarios para la captura y expresión de genes exógenos, llamados cassettes: uno que codifica una integrasa (*intl*), el otro es el lugar de recombinación sitio-específico (*attI*) y, por último, un promotor para la expresión de los genes cassetes integrados. A veces contienen un segundo promotor más fuerte, localizado adyacentemente a 3' del primero (Recchia *et al*, 1995).

Estructuralmente se suele hablar de tres regiones: una región constante 5', una región central variable donde por lo regular se encuentran los genes estructurales del integrón y otra región constante 3'.

Actualmente se conocen 4 clases de integrones los cuales difieren por la estructura de su integrasa y el más estudiado ha sido el de clase 1. Se han encontrado integrones de las clases 1 y 2 en plásmidos y transposones (Gonzales *et al*, 2004), en tanto aquellos de clase 3 sólo han sido observados en plásmidos (Arakawa *et al*, 1995). Por último, los integrones de clase 4 o "superintegrones" se han identificado principalmente en el cromosoma de *Vibrio cholerae* (Manning *et al*, 1997 y Mazel *et al*, 1998).

Probablemente, los integrones no son móviles por sí mismos, pero con frecuencia se hallan en transposones que a su vez se encuentran en plásmidos conjugativos, por lo que su movilidad horizontal está asegurada, como se constata por su amplia difusión entre las bacterias (Sabaté *et al*, 2002).

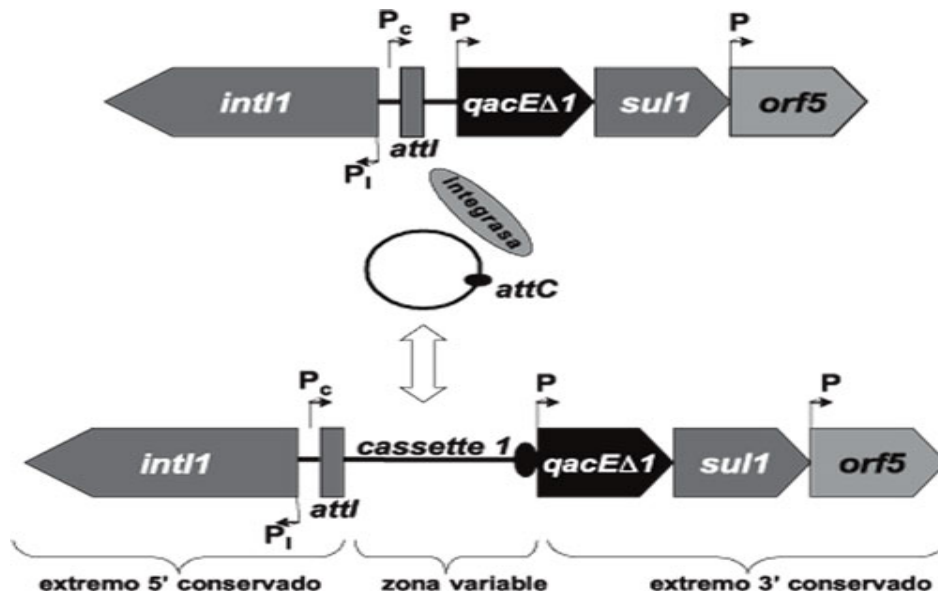


Figura 19. Esquema de un integrón. Tomada de Gonzalez, G. *et al.* 2004.

### Mecanismos de resistencia.

Como anteriormente se mencionó, existen diferentes estructuras genéticas que pueden conferir mecanismos a las bacterias portadoras para que posean un fenotipo de resistencia a los antibióticos. Existen tres grupos de mecanismos de resistencia en contra de los antibióticos, dos de ellos estudiados desde hace décadas: las modificaciones del blanco del antibiótico por procesos de mutación o procesos post-traduccionales y la inactivación del antibiótico por hidrólisis o modificación de su estructura. Y el tercer mecanismo estudiado mas recientemente: las bombas de expulsión (Blair, J. *et al.*, 2014).



## **Modificación del blanco del antibiótico por procesos de mutación o procesos post-traduccionales.**

La estructura de los antibióticos ya sea producidos de forma natural o sintéticos están diseñados de tal manera que tengan alta afinidad con su diana para así poder inhabilitar la función principal de esta, ya sea un componente indispensable para la supervivencia de la célula, o que esta sea necesaria para los procesos infecciosos.

Un proceso muy conocido desde hace décadas es donde la estructura de la diana puede ser modificada por la misma bacteria mediante dos procesos:

- Una mutación directa en el genoma (provocando un alelo mutante) la cual no permita la unión del antibiótico con esta, afectando directamente la estructura y propiciando a la diana mantener su función original inalterada.
- Una modificación post-traducciona, mediante la ayuda de alguna enzima que pueda modificar la estructura de la diana agregando algún grupo funcional que reduzca la afinidad del antibiótico por esta y por ende una unión pobre o poco eficiente dejando como resultado una diana inalterada y capaz de llevar a cabo sus funciones habituales.

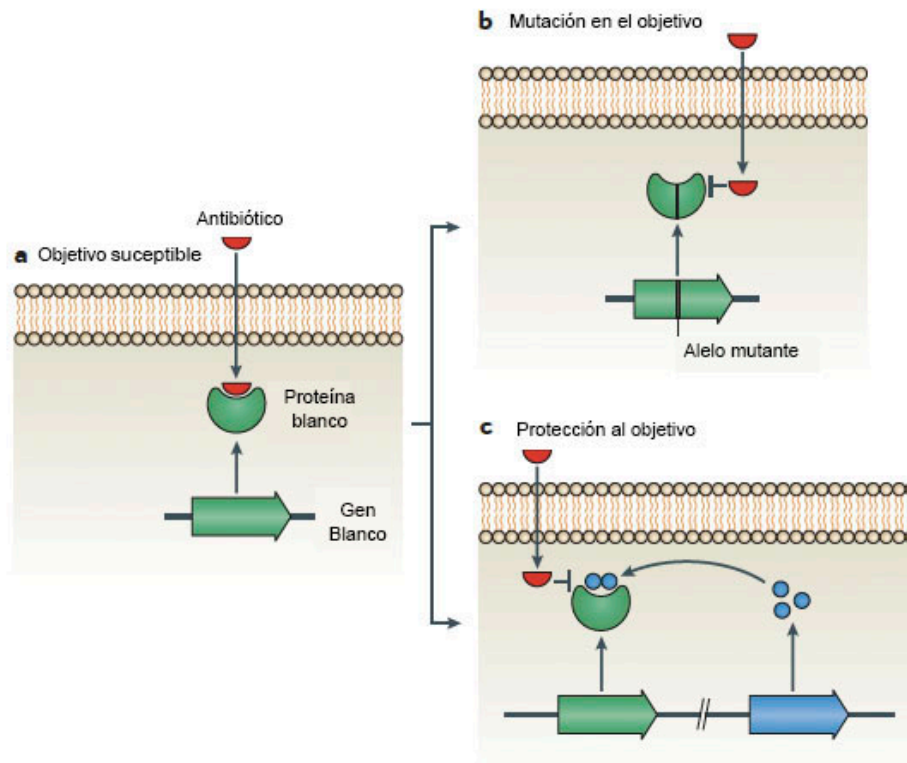


Figura 20. Mecanismos de modificación de la diana. Tomada de Blair, J. M. A. *et al.* 2015.

### **Inactivación del antibiótico por hidrólisis o modificación de su estructura.**

Otro mecanismo de defensa bastante conocido es la inactivación del antibiótico por parte de enzimas especializadas. Este mecanismo puede ser dividido en dos procesos:

- Debido a la producción por parte de la bacteria de enzimas que sean más afines por el antibiótico que estos por la diana, provocando su unión al antibiótico y posteriormente resultando en la hidrólisis de este (como es el caso de las beta-lactamasas) teniendo como resultado la protección de la diana e inactivación del antibiótico.

- Producción de enzimas que puedan modificar la estructura del antibiótico, agregando grupos funcionales los cuales disminuirán la afinidad de este por su diana, propiciando así una baja o nula afinidad, dejando intacta a la diana y permitiendo su habitual funcionamiento. Ejemplos de estas enzimas son: acetiltransferasas, fosfotransferasas y nucleotidiltransferasas, entre otras.

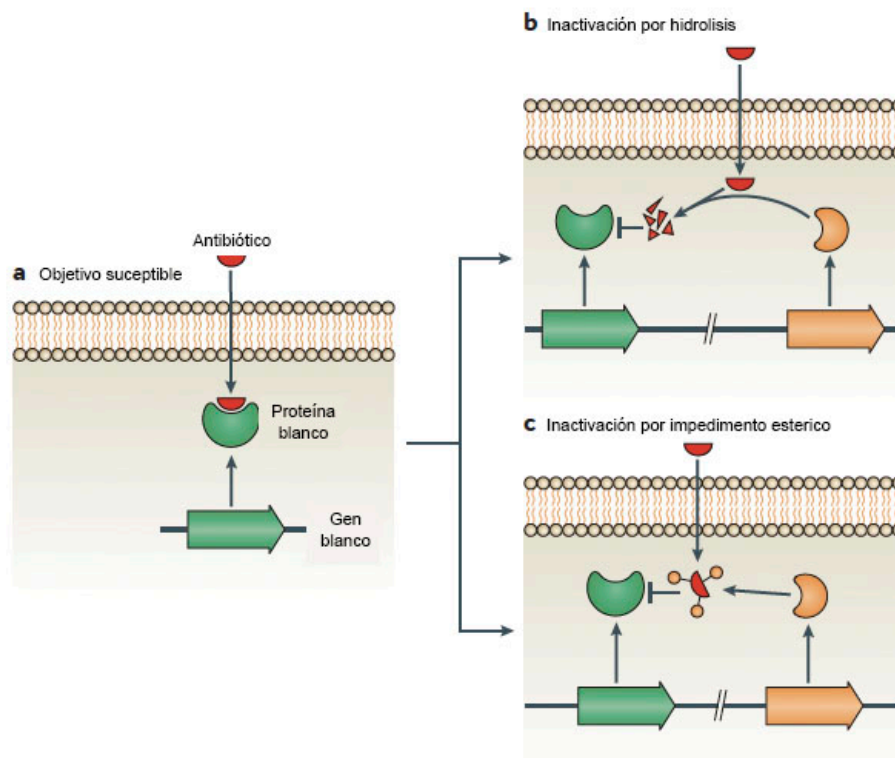


Figura 21. Mecanismos de inactivación de antibióticos. Tomada de Blair, J. M. A. *et al.* 2015.

### Bombas de expulsión.

Las bombas de expulsión son un mecanismo de resistencia a los antibióticos menos estudiado que los anteriormente mencionados, las cuales son sistemas de transporte activo que pueden ser de tipo primario o secundario. Son multiespecíficas para los ligandos que transportan y se han encontrado en

diferentes tipos y clases de organismos; son proteínas de membrana, las cuales expulsan fuera de las células distintas moléculas que pueden o no tener relación estructural.

Esto tiene gran relevancia en el área clínica ya que una misma bacteria mediante estos sistemas de transporte puede expulsar varios tipos de moléculas tóxicas, presentando un fenotipo de resistencia a estas sin la necesidad de tener algún mecanismo tal como modificación del blanco o inactivación del antibiótico.

Además, este mecanismo contribuye en mayor proporción a la resistencia intrínseca de las bacterias a muchos agentes tóxicos o antimicrobianos (Zgurskaya, H. 2002).

A pesar de la gran cantidad de información que se tiene a cerca de estas bombas de expulsión, aún no se identifica exactamente el mecanismo de acción mediante el cual expulsan a moléculas tóxicas tales como los antibióticos y cómo hacen éstas para reconocerlo una vez que entran a la célula bacteriana. Estas se encuentran tanto en bacterias Gram positivas como bacterias Gram negativas.

Además, se ha revelado que las bombas de expulsión también juegan un rol importante en la patogenicidad de las bacterias ya que pueden exportar factores de virulencia tales como adhesinas, toxinas y algunas proteínas (Piddock, L. 2006). Estas están codificadas tanto en el genoma bacteriano como en elementos genéticos móviles como pueden ser plásmidos, transposones e integrones.

Las bombas de expulsión se pueden clasificar en cinco familias:

1. RND (Resistance Nodulation Cell Division)
2. MFS (Major Facilitator Superfamily)
3. ABC (ATP Binding Cassette)
4. MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion)
5. SMR (Small Multidrug Resistance)

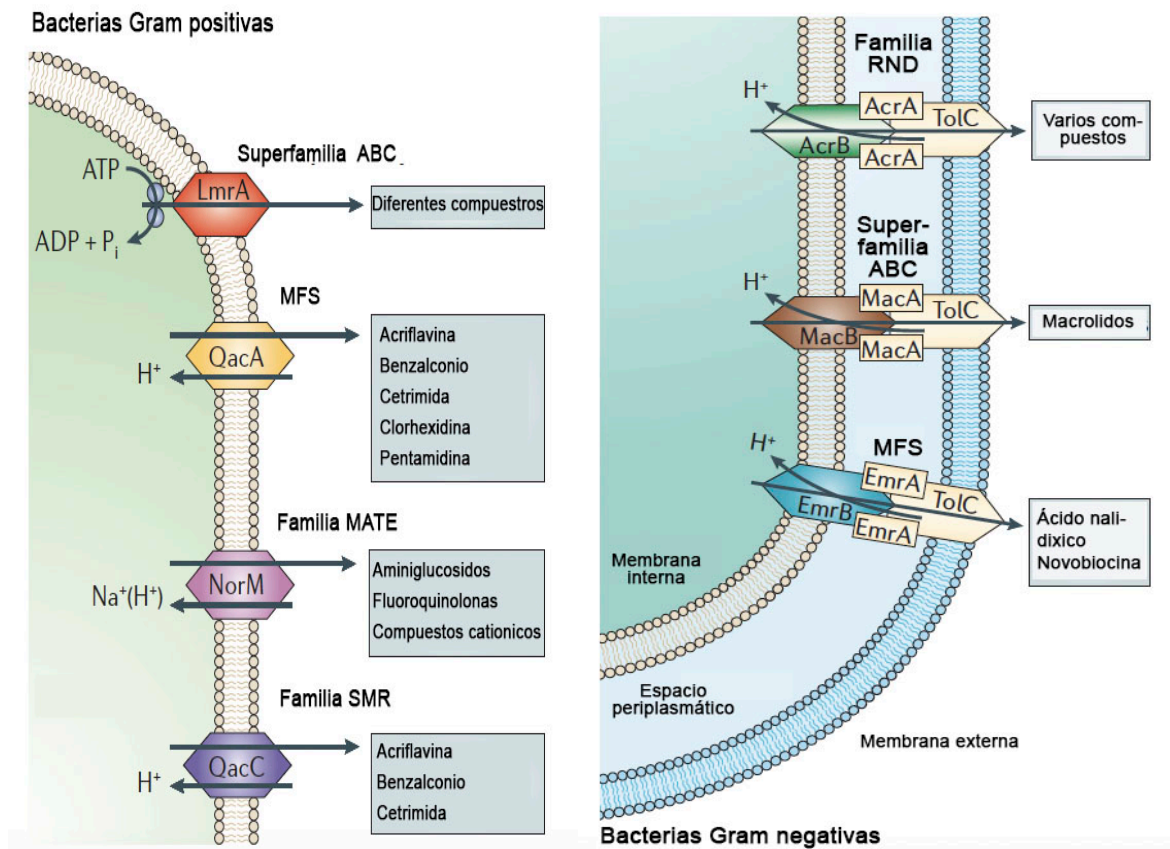


Figura 22. Bombas de expulsión presentes en bacterias Gram positivas y negativas. Tomada de Piddock, L. J. V. 2006.

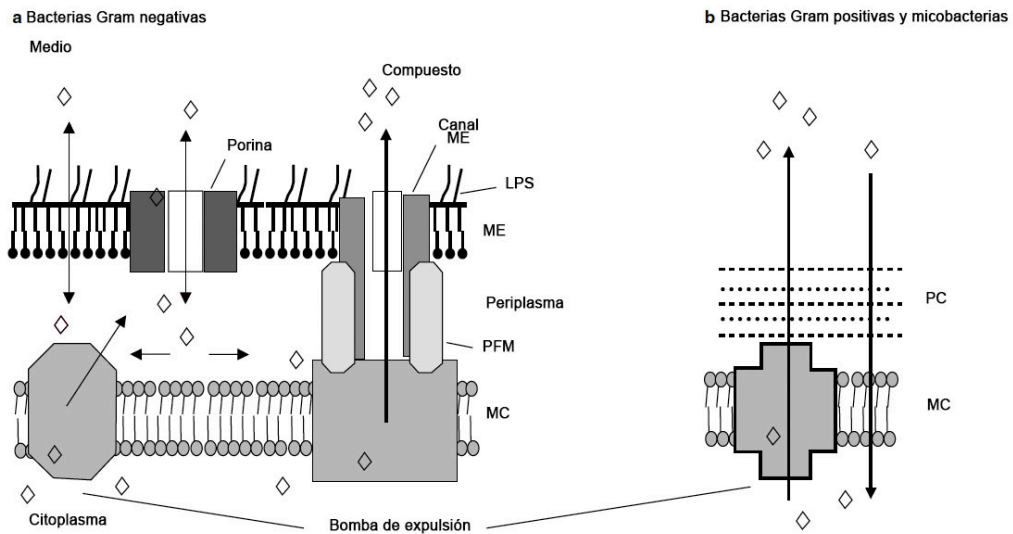


Figura 23. Bombas de expulsión presentes en bacterias Gram positivas y negativas. Tomada de Li, X. Z y Nikaido, H. 2004.

A su vez, estas familias de bombas de expulsión se pueden dividir de acuerdo al tipo de transporte; de transporte activo primario donde la única familia es la de tipo ABC ya que utilizan directamente ATP para realizar su función, mientras que las otras 4 familias son de tipo transporte activo secundario donde 3 de estas (SMR, RND y MFS) utilizan un gradiente electroquímico de protones, mientras que la familia MATE puede utilizar además de un gradiente electroquímico de protones también un gradiente electroquímico de iones sodio.

Las familias MFS (asociada principalmente con bacterias Gram positivas) y RND (asociada principalmente con bacterias Gram negativas) (Piddock, L. 2006), son las más importantes debido a la gran cantidad de compuestos que pueden expulsar (Nikaido, H. 2009).

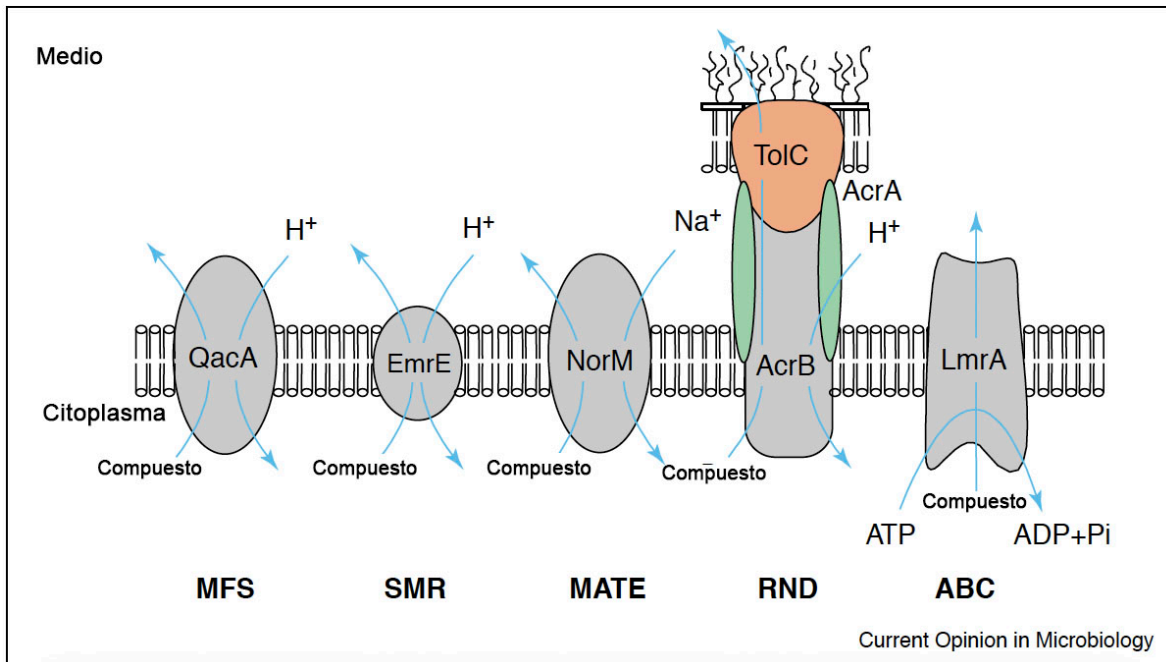


Figura 24. Esquema del tipo de transporte de las 5 familias de bombas de expulsión. Tomada de Paulsen, I. T. 2003.

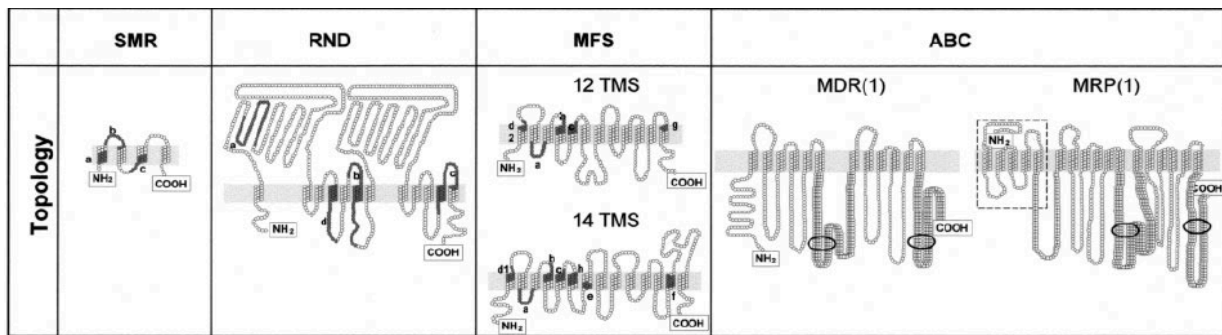


Figura 25. Esquema de la topología de las diferentes familias de bombas de expulsión. Tomado de Bambeck, F. V. *et al.* 2000.

## Resistoma.

El resistoma se puede definir como todo el conjunto de elementos, sus precursores (Wright, G. 2007) y mecanismos, presentes en cualquier microorganismo, en este caso bacterias ya sea patógenas, oportunistas o comensales, capaces de propiciar directa o indirectamente (Olivares, J. 2013) un fenotipo de resistencia contra sustancias tóxicas o antimicrobianas, destacando

entre ellas los antibióticos. Además, se cree que está en constante expansión y que existe mucho antes de la introducción de los agentes antimicrobianos para el mejoramiento de la salud humana.

Las bacterias que poseen un resistoma bastante amplio en contra de agentes tóxicos o antimicrobianos y presentan un fenotipo de multirresistencia a estas sustancias son usualmente llamadas súper bacterias (Wright, G. 2007).

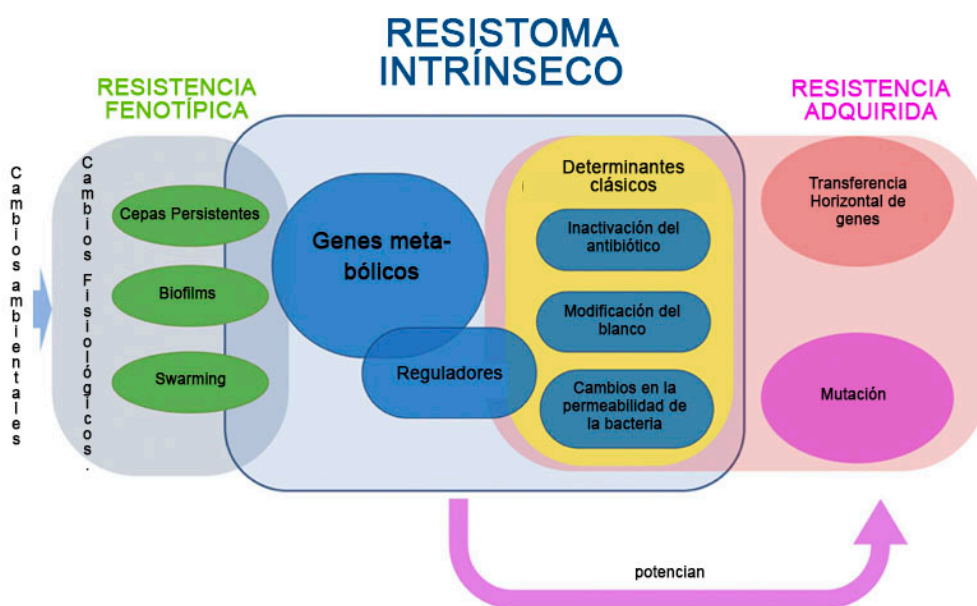


Figura 26. Esquema del resistoma bacteriano y sus componentes. Tomada de Olivares, J. *et al.* 2013.

### Microbioma humano.

El cuerpo humano contiene  $10^{14}$  células, de las cuales solo el 10% son células que componen el cuerpo y el 90% restante son células pertenecientes al microbioma/microflora (Hooper, L. V. *et al.*, 1998).

Se sabe que el microbioma es dinámico y una compleja mezcla de microorganismos que tienen diversas funciones entre ellas la digestión de nutrientes esenciales, maduración de la fisiología intestinal, estimulación del



sistema inmune, efectos sistémicos en los lípidos sanguíneos y la inhibición de bacterias peligrosas para el ser humano (McFarland, L. V., 2000).

Además se sabe que el microbioma varía dependiendo de la región del cuerpo, la edad, el área geográfica, el estado de salud (Gordon, R., 1993 y Salminen, S. *et al*, 1995) incluso dentro de un mismo individuo la composición del microbioma puede verse alterada por cambios en la dieta, estrés, comportamiento sexual, medicación, alteraciones hormonales y otros factores relacionados con el individuo (Salminen, S. *et al*, 1995, Keane, F.E. *et al*, 1997, Martin, H. L. *et al*, 1999, Marshall, J. C. *et al*, 1999, Priestley, C. J. *et al*, 1997).

Debido a todo esto podemos suponer que de acuerdo a la región que se analice del cuerpo encontraremos un microbioma diferente y por ende un resistoma diferente.

En el presente trabajo se tratará de analizar y comparar el microbioma proveniente de dos regiones diferentes, la región ocular y rectal-anal, una más séptica que otra y sus posibles mecanismos de resistencia a los antimicrobianos más específicamente a los antibióticos y como algunos compuestos desacoplantes del gradiente electroquímico tienen o no un efecto sobre estos.

## **OBJETIVO GENERAL:**

Comparación de cepas bacterianas con un posible fenotipo de multirresistencia a los antibióticos aisladas de dos diferentes regiones corporales; la región ocular, la cual es considerada una zona habitualmente poco séptica y la región del esfínter anal la cual es considerada una región completamente séptica.

## **Objetivos particulares:**

1. Crecimiento, aislamiento, purificación y selección de bacterias cultivables con un posible fenotipo de multirresistencia a los antibióticos provenientes de las regiones ocular y rectal anal.
2. Prueba de tolerancia al bromuro de etidio en cepas seleccionadas.
3. Determinación de resistencia a antibióticos (método de Kirby- Bauer).
4. Determinación del efecto del 2,4-dinitrofenol y del omeprazol sobre el crecimiento y el fenotipo de multirresistencia a los antibióticos.
5. Determinar la posible amplificación genética de secuencias que codifican para de las bombas de expulsión más representativas de las cepas estudiadas según la literatura mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## **HIPOTESIS**

Existen bacterias multirresistentes a antibióticos por sobre expresión de bombas de expulsión tanto en el saco óculo-conjuntival como en la región ano-rectal de individuos jóvenes asintomáticos con una posible mayor frecuencia en la región séptica terminal de tubo digestivo que en la región ocular.

## METODOLOGÍA

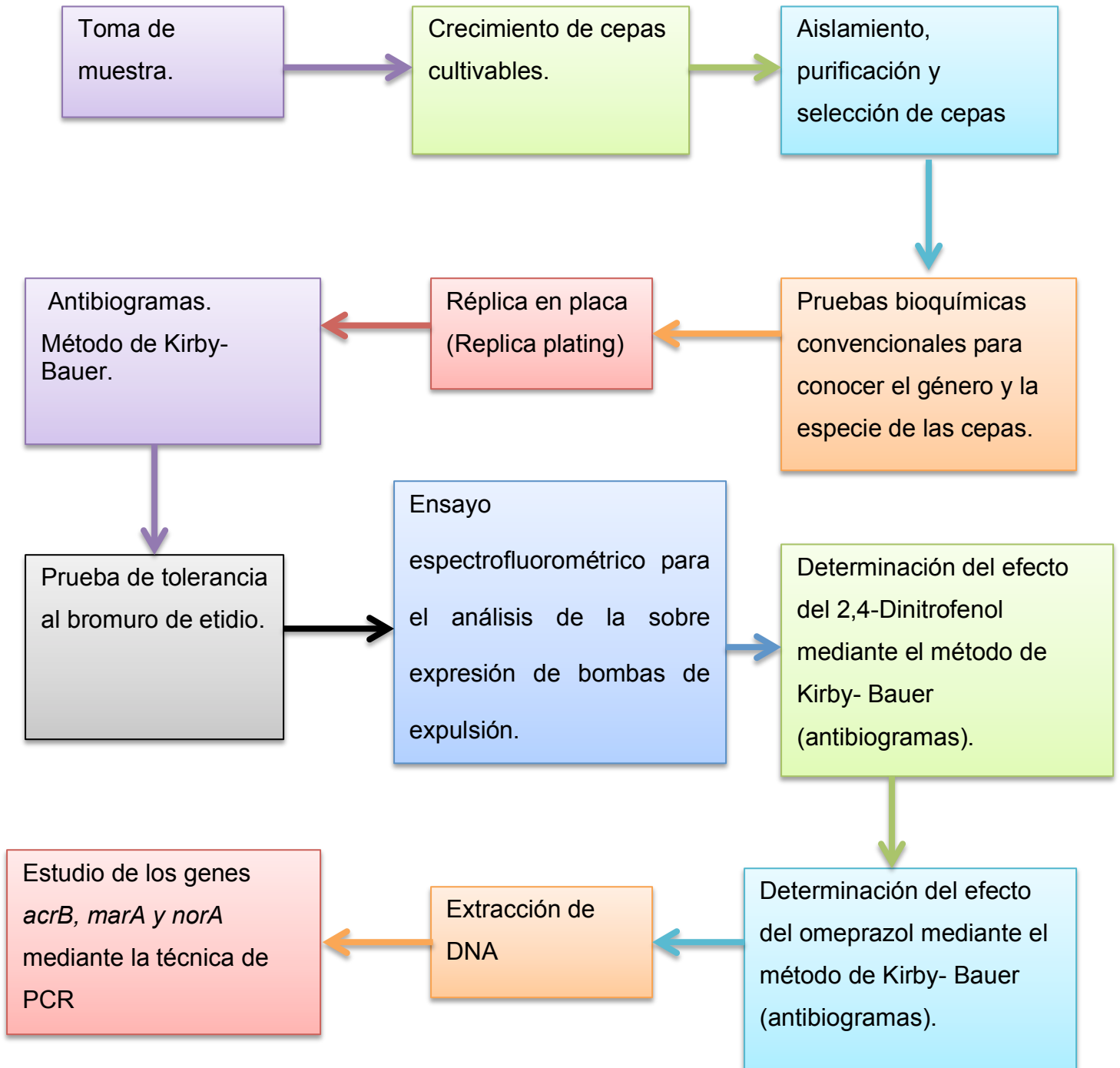


Diagrama 1. Diseño experimental.

### **1) Toma de muestra.**

Se realizaron exudados conjuntival-palpebral y rectal-anal provenientes de 10 individuos jóvenes asintomáticos de ambos sexos, estudiantes de la Facultad de Química de la UNAM con edades entre 20 y 22 años mediante la técnica de hisopo para la obtención de las muestras conforme al Manual para la toma, envío y recepción de muestras para diagnóstico (remu-ma-01) de la Secretaria de Salud, aunque con pequeñas modificaciones adecuadas para el inmediato crecimiento de las cepas.

#### **Muestreo región ocular:**

Hay que inclinar un poco hacia atrás la cabeza del paciente y pedirle que fije la mirada hacia arriba, exponer la conjuntiva inferior aplicando una ligera presión del párpado inferior con el dedo índice para exponer la conjuntiva; posterior a ello introducir un hisopo de rayón o dacrón frotando con cuidado en ambas superficies conjuntivales y rotarlo para asegurar que toda la superficie de la conjuntiva se está muestreando. El hisopo se introdujo en el tubo de ensayo que contiene 3 mL de medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI) estéril.

#### **Muestreo región rectal-anal:**

Tomar la muestra introduciendo la punta de un hisopo de algodón, previamente humedecido en solución salina estéril o medio de transporte, en el orificio anal y rotarlo ligeramente. La presencia de un ligero color café en el hisopo indica que la muestra ha sido bien tomada. Se introdujo el hisopo con la muestra hasta el fondo de un tubo de tapón de rosca con medio de cultivo estéril que contenía 3 mL de infusión cerebro corazón (BHI).

## **2) Crecimiento de cepas cultivables.**

Se utilizó un medio de cultivo enriquecido, de tal manera que permitiera a las cepas cultivables obtener los nutrientes necesarios para su óptimo desarrollo y crecimiento. El medio utilizado fue BHI, ideal para el crecimiento bacteriano. Una vez inoculada la muestra, ésta se dejó incubando por 24 horas a 37°C.

Después de 24 horas se realizó una tinción de Gram a los cultivos para observar que tipo de bacterias había de acuerdo a la tinción.

## **3) Aislamiento, purificación y selección de cepas.**

Una vez observada la tinción de Gram se procedió a aislar colonias puras en medios de cultivo selectivos para bacterias Gram positivas (MSA) y Gram negativas (MacConkey) por el método de cuadrante radial; se incubó por 24 horas a 37°C y se seleccionaron colonias aisladas donde se presentó crecimiento. Como anteriormente se mencionó, se seleccionaron a aquellas colonias que presentaran una velocidad de crecimiento razonable para los fines experimentales. Se seleccionaron 3 colonias Gram positivas y 3 colonias Gram negativas.

## **4) Pruebas bioquímicas convencionales para conocer el género y la especie de las cepas.**

Se verificó la pureza de las cepas y se procedió a realizar las pruebas bioquímicas convencionales correspondientes para cada cepa bacteriana dependiendo de su morfología microscópica (cocos o bacilos) y también a los resultados obtenidos en la tinción de Gram.

### **5) Réplica en placa (Replica plating).**

Se realizó análisis porcentual de resistencia a los antibióticos a las muestras iniciales obtenidas provenientes de la región ocular y rectal anal mediante la técnica de réplica en placa (replica plating) de Lederberg (Lederberg, J. 1952).

### **6) Antibiogramas (Método de Kirby- Bauer).**

A las cepas puras aisladas de las muestras iniciales se les realizaron antibiogramas por el método estandarizado de Kirby-Bauer (Lieberman, D. 1975) para conocer la resistencia de estas a diferentes antibióticos. Se utilizaron dos tipos de sensidiscos en función del Gram de las cepas. Se utilizó un medio de cultivo base Mueller-Hinton para la siembra masiva de las cepas bacterianas la cual se ajustó al 0.5 de la curva de McFarland ( $1.5 \times 10^8 \mu\text{o}/\text{mL}$ ).

### **7) Prueba de tolerancia al bromuro de etidio.**

Se realizó una prueba de tolerancia a bromuro de etidio con concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en 3 mL de medio BHI. Se sembró una cantidad de microorganismo tal que la concentración inicial dentro cada tubo en la prueba de bromuro fuese igual al 0.5 de la curva de McFarland ( $1.5 \times 10^8 \mu\text{o}/\text{mL}$ ).

**8) Ensayo espectrofluorométrico para el análisis de la sobre expresión de bombas de expulsión.**

Las cepas aisladas se dejaron crecer durante 24 horas a 37°C y se ajustaron a 0.7 de densidad óptica a 600 nanómetros. Se les adicionó bromuro de etidio y se incubaron por 20 minutos. Se realizó una segunda dilución para ajustar las cepas a una densidad óptica de 0.4. Se centrifugó y decantó el sobrenadante y posteriormente se suspendió el pellet en medio fresco (BHI) (Kaatz G. W., *et al.* 2000). Se tomaron lecturas utilizando un espectrofluorometro, marca Hitachi, el cual se ajustó a una longitud de onda de excitación de 540 nanómetros y una longitud de onda de emisión de 545 nanómetros. Se utilizó como control negativo para las bacterias Gram negativas a *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ATCC 53868 y para las Gram positivas a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; estas cepas son sensibles a todos los antibióticos.

**9) Determinación del efecto del 2,4-Dinitrofenol sobre el fenotipo de resistencia a antibióticos mediante el método de Kirby-Bauer (antibiogramas).**

Se prepararon antibiogramas por el método de Kirby-Bauer (Lieberman, D. 1975) con 2,4-DNP y los correspondientes sensidiscos de acuerdo al Gram de la bacteria. Se utilizó un medio de cultivo base Mueller-Hinton para la siembra masiva de las cepas bacterianas la cual se ajustó al 0.5 de la curva de McFarland ( $1.5 \times 10^8 \mu\text{o}/\text{mL}$ ). Se preparó un stock de 2,4-DNP (0.35M) para utilizarlo a una concentración final de 0.003M en bacterias Gram negativas y 0.0005M en



bacterias Gram positivas; estas concentraciones fueron determinadas previamente con una prueba de tolerancia al 2,4-DNP para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI).

#### **10) Determinación del efecto del omeprazol sobre el fenotipo de resistencia a antibióticos mediante el método de Kirby- Bauer (antibiogramas).**

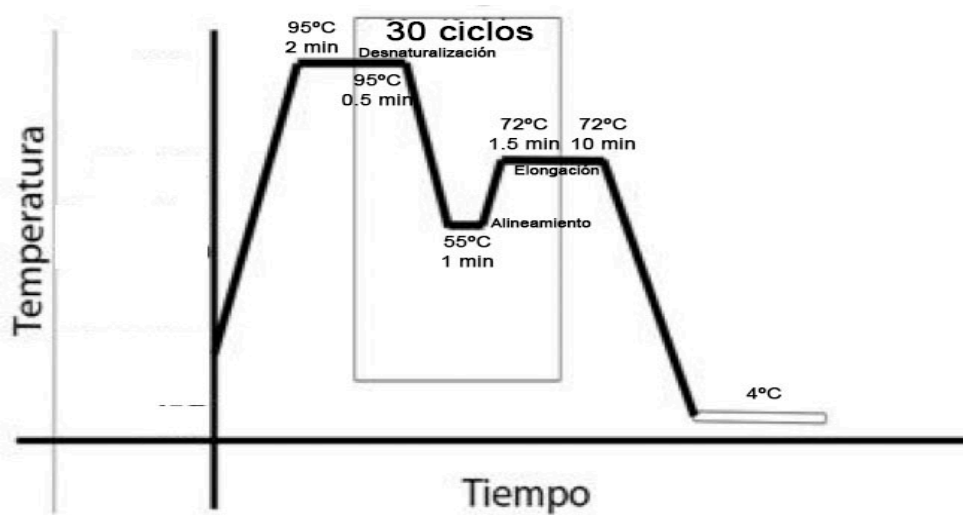
Se prepararon antibiogramas por el método de Kirby-Bauer (Lieberman, D. 1975) con omeprazol y los correspondientes sensidiscos de acuerdo al Gram de la bacteria. Igual que en el caso anterior, se utilizó un medio de cultivo base Mueller-Hinton para la siembra masiva de las cepas bacterianas la cual se ajustó al 0.5 de la curva de McFarland ( $1.5 \times 10^8 \mu\text{o}/\text{mL}$ ). En este caso, la preparación de un stock de omeprazol fue de  $6000 \mu\text{g}/\text{mL}$  para utilizarlo a una concentración final de  $128 \mu\text{g}/\text{mL}$  y  $300 \mu\text{g}/\text{mL}$  en bacterias Gram negativas y en bacterias Gram positivas respectivamente de acuerdo a la literatura (Jonkers, D. *et al.* 1996, Ni, W. *et al.* 2014, Vidaillac, C. *et al.* 2007).

#### **11) Extracción de DNA**

Se realizó la extracción de DNA mediante el método de Cheng, H. R. & Jiang, N. (Cheng, H. R. & Jiang, N., 2006) con modificaciones y se observó mediante electroforesis en un gel de agarosa. Se obtuvo el DNA para el posterior estudio de los genes *acrB*, *marA* y *norA* mediante la técnica de PCR.

## 12) Estudio de los genes *acrB*, *marA* y *norA* mediante la técnica de PCR

Se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con ayuda del kit GoTaq<sup>R</sup> PCR Core Systems marca Promega para observar la presencia de los genes de las bombas de expulsión más frecuentemente reportadas de las cepas estudiadas según la literatura y observar su posible amplificación en un gel de agarosa mediante electroforesis. Ver diseño de primers en anexo I.



Reactivo	Volumen	Concentración final
MgCl <sub>2</sub> 25mM	3μL	1.5mM
5XGreen GoTaq <sup>R</sup> Flexi Buffer	10μL	1X
PCR Nucleotide Mix 10mM	1μL	200μM
Primer FW 1μM	5μL	5pmol
Primer RV1μM	5μL	5pmol
GoTaq <sup>R</sup> DNA Polimerasa 5u/μL	0.25μL	1.25u
DNA molde	variable	-----
Agua	c.b.p	-----
Volumen final	50μL	-----

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Pruebas bioquímicas

Con el propósito de conocer el género y la especie de las cepas estudiadas se realizaron las pruebas bioquímicas dependiendo del resultado observado en las tinciones de Gram realizadas.

### Bacterias Gram positivas.

Prueba bioquímica	Cepa A5	Cepa T10	Cepa WT5
<b>Catalasa</b>	+	+	+
<b>Coagulasa</b>	+	+	+

Cuadro 1. Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas. Muestran que las cepas son *Staphylococcus aureus*.

### Bacterias Gram negativas.

Prueba bioquímica	Cepa Ba	Cepa Es	Cepa Vs
<b>Glucosa</b>	+	+	+
<b>Lactosa</b>	+	+	+
<b>Acido sulfhídrico</b>	-	-	-
<b>Indol</b>	+	+	+
<b>Movilidad</b>	+	+	+
<b>Citrato</b>	-	-	-
<b>Urea</b>	-	-	-
<b>Manitol</b>	+	+	+

Cuadro 2. Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas muestran que todas las cepas son *Escherichia coli*.

Una vez tomadas las muestras y cultivadas en los medios selectivos se seleccionaron 6 cepas con una velocidad de crecimiento aceptable para el desarrollo de los experimentos, de las cuales se puede observar en los cuadros 1 y 2 que tres son Gram positivas y tres Gram negativas. Además, el 100% de bacterias aisladas de la región ocular fueron Gram positivas y el 100% de las bacterias aisladas de la región recto-anal fueron Gram negativas. Cabe destacar que el 100% de las bacterias Gram positivas aisladas son de la especie *Staphylococcus aureus* y el 100% de las bacterias Gram negativas aisladas son de la especie *Escherichia coli*. Para la región ocular solo se pudieron seleccionar bacterias Gram positivas ya que no hubo crecimiento en los medios selectivos para bacterias Gram negativas. El mismo fenómeno ocurrió con la muestra de la región recto-anal pero con bacterias Gram negativas, ya que en los medios selectivos para bacterias Gram positivas no se presentó crecimiento alguno. Estos resultados concuerdan con Willcox, M. quién menciona que la mayor parte de las bacterias presentes cultivables son Gram positivas y pertenecen a los géneros estafilococos y estreptococos, mientras que las bacterias Gram negativas se presentan en un porcentaje mínimo de aislamiento o casi no se presentan (Willcox, M., 2013). Por otra parte, Tenailon, O. *et al.* (Tenailon, O. *et al.*, 2010) mencionan que el microorganismo aeróbico predominante del intestino humano es *E. coli*. lo cual se puede comprobar con las cepas seleccionadas de la región recto-anal.

Con los datos obtenidos hasta este punto se puede observar que los microorganismos aislados de las mismas regiones del cuerpo en diferentes

individuos son más similares entre sí que los microorganismos aislados de diferentes regiones del cuerpo en un mismo individuo (Sonnenburg y Fischbach, 2011).

### **Réplica en placa (Réplica plating).**

Con el objeto de conocer la proporción de bacterias resistentes a antibióticos presentes en las muestras totales originales se procedió a llevar a cabo una réplica en placa. Los resultados obtenidos pueden apreciarse en el cuadro 3.

<b>Muestra</b>	Porcentaje de Resistencia a trimetoprim/ sulfametoxazol.	Porcentaje de resistencia a ampicilina.
<b>1 (Vs)</b>	100	100
<b>2 (Ba)</b>	100	100
<b>3 (Es)</b>	100	100
<b>4 (T10)</b>	4.14	100
<b>5 (WT5)</b>	16.5	100
<b>6 (A5)</b>	5.53	100

Cuadro 3. Porcentaje de bacterias resistentes a los antibióticos mostrados en la población total. Muestra 1 – 3 corresponden a muestro región recto-anal, muestra 4 – 6 corresponden amuestro región ocular. Entre paréntesis se muestra la cepa que se aisló para los posteriores experimentos.

Los antibióticos utilizados fueron ambos de amplio espectro: ampicilina y trimetoprim con sulfametoxazol (Huovinen, P. *et al.* 1995).

Por otra parte, para conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos sobre dichas bacterias se utilizó el método de dilución, en el cual se varió la concentración de los antibióticos y después de su incubación a 37°C y 24 horas se observó hasta qué concentración utilizada del antibiótico eran capaces de crecer las bacterias. Para el antibiótico ampicilina, todas las cepas tanto Gram positivas como Gram negativas presentaron un crecimiento hasta la máxima

concentración utilizada que fue de  $500\mu\text{g}/\text{mL}$  la cual se utilizó para la técnica de *replica plating*, lo que nos indica que es una concentración casi 5 veces superior a la que reporta Andrews, J.M. 2001 para enterobacterias y estafilococos, y una concentración 2.5 mayor de lo que reporta Retsema, J. A. 1980 para *S. aureus*. Esto quizás puede deberse a que este es un antibiótico de tipo  $\beta$ -lactámico, el cual inhibe la formación de la pared celular. Estos antibióticos fueron de los primeros en utilizarse como antimicrobianos y, al paso del tiempo, han seguido siendo ampliamente utilizados para tratamientos de infecciones, por lo que es probable que las bacterias han tenido mucho tiempo para adaptarse a concentraciones elevadas de este tipo de fármacos.

Por otra parte, para el antibiótico trimetoprim con sulfametoxazol se observó que las bacterias Gram negativas resistieron a la concentración más alta probada que en este caso también fue la misma que para ampicilina,  $500\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo cual concuerda con lo reportado por Charpentier, E. *et al.* 1997 en que la resistencia a este antibiótico se encuentra mayoritariamente en bacterias Gram negativas especialmente en enterobacterias siendo este el caso de las cepas Gram negativas que se estudiaron (*E. coli*) y en el que, de igual manera que para la ampicilina, podemos observar que la concentración es casi 5 veces mayor que lo reportado por Andrews, J.M. 2001. Esto quizás se debe, entre otras cosas, a que el costo de este antibiótico es relativamente bajo, lo cual aumenta su uso para varios casos de infecciones (Huovinen, P. 2001). Para las bacterias Gram positivas se observa que estas presentan un porcentaje muy bajo de resistencia lo cual no necesariamente indica que son sensibles a este antibiótico lo que posteriormente se confirmó con los resultados obtenidos con los antibiogramas.

## Clasificación de los antibióticos utilizados para los antibiogramas.

Compuesto	Familia/Grupo	Función
Ampicilina	$\beta$ –lactamico	Inhibición de la pared celular.
Amikacina	Aminoglucosido	Inhibición de la síntesis proteica.
Carbencilina	$\beta$ –lactamico	Inhibición de la pared celular.
Cefalotina	$\beta$ –lactamico	Inhibición de la pared celular.
Cefotaxima	$\beta$ –lactamico	Inhibición de la pared celular
Cloranfenicol	Anfenicoles	Inhibición de la síntesis proteica.
Clindamicina	Lincosamidas	Inhibición de la síntesis proteica.
Ciprofloxacino	Quinolonas	Alteración en el metabolismo estructura de los ácidos nucleicos.
Dicloxacilina	$\beta$ –lactamico	Inhibición de la pared celular.
Eritromicina	Macrolido	Inhibición de la síntesis proteica.
Gentamicina	Aminoglucosido	Inhibición de la síntesis proteica.
Netilmicina	Aminoglucosido	Inhibición de la síntesis proteica.
Nitrofurantoina	Nitrofurano	Alteración en el metabolismo estructura de los ácidos nucleicos.
Norfloxacina	Quinolonas	Alteración en el metabolismo estructura de los ácidos nucleicos.
Penicilina	$\beta$ –lactamico	Inhibición de la pared celular.
Sulfametoxazol/ trimetoprim	Sulfonaminas/ diaminopirimidias	Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos.
Tetraciclina	Tetraciclina	Inhibición de la síntesis proteica.
Vancomicina	Glucopéptido	Inhibición de la pared celular.

Cuadro 4. Ver estructura de los antibióticos en anexo II.

## Prueba de tolerancia al bromuro de etidio.

Concentración Bromuro de etidio ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	5	10	20	40	60	80	100
Cepa WT5	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	No presenta crecimiento	No presenta crecimiento	No presenta crecimiento	No presenta crecimiento
Cepa T10	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	No presenta crecimiento	No presenta crecimiento	No presenta crecimiento	No presenta crecimiento
Cepa A5	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	No presenta crecimiento	No presenta crecimiento	No presenta crecimiento	No presenta crecimiento
Cepa Vs	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento
Cepa Es	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento
Cepa Ba	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento	Si presenta crecimiento

Cuadro 5. Resultados obtenidos de la prueba de tolerancia al bromuro de etidio

En el cuadro 5 podemos observar los resultados de la prueba de tolerancia al bromuro de etidio. Este es un análisis en el cual se puede elucidar si las bacterias seleccionadas podrían presentar o no sobre-expresión de las bombas de expulsión en su membrana, pues el bromuro de etidio es un compuesto intercalante del DNA, es decir, forma un complejo con este, impidiendo así el correcto funcionamiento de las células conllevándolas a su muerte. Por ende, estas necesitan disminuir la concentración del compuesto dentro de ellas y para esto necesitan de las bombas de expulsión, pues se ha demostrado que el bromuro de etidio es un colorante aromático, catiónico (ver estructura anexo II) que es expulsado de la célula mediante este tipo de mecanismo (Grinius and Goldberg, 1994). Por lo tanto, mientras más elevada sea la concentración de bromuro de etidio en el medio, las bacterias tendrán que expresar una mayor



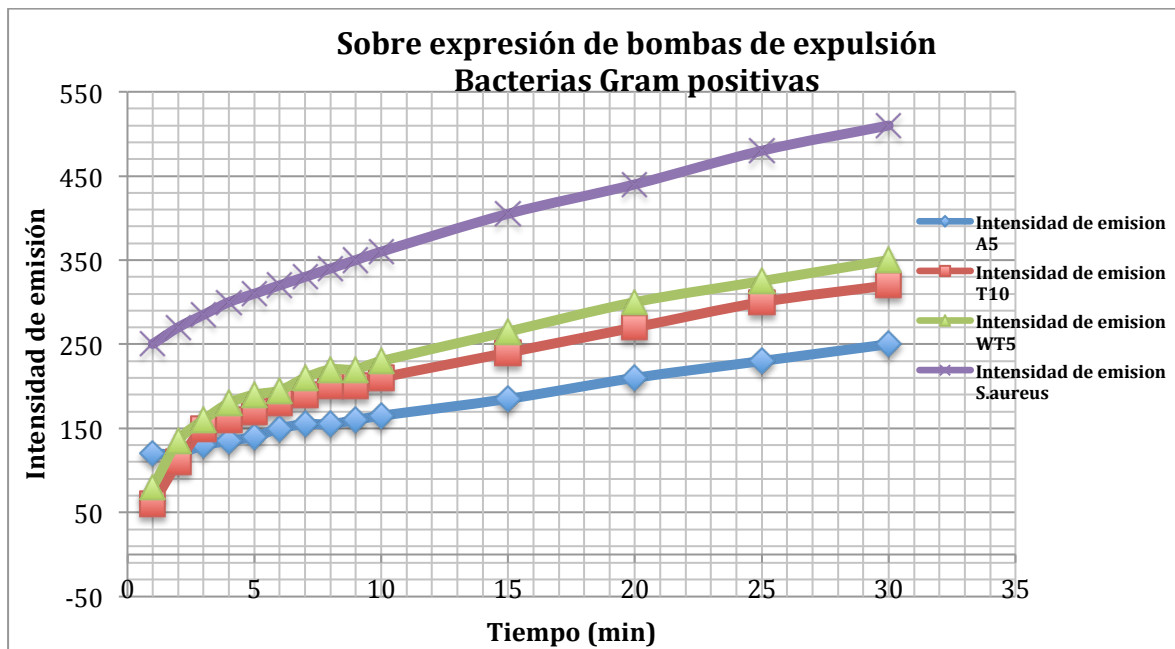
cantidad de bombas de expulsión para echar fuera este compuesto y de esta manera sobrevivir.

Se puede observar que las bacterias Gram negativas toleraron todas las concentraciones de bromuro de etidio probadas, presentándose incluso un crecimiento abundante en la concentración más elevada sugiriendo que quizá existe una sobre expresión de las bombas, mientras que las bacterias Gram positivas toleraron hasta una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  siendo esta una quinta parte de lo que toleraron las bacterias Gram negativas. Esto quizá podría deberse al medio del cual fueron aisladas ya que si bien las bacterias que se aislaron de la región ocular están en contacto directo con el medio ambiente y expuestas a diferentes compuestos, existen otros mecanismos de defensa en esta región tales como enzimas que degraden compuestos tóxicos o las barreras naturales que protegen esta región como cejas y pestañas, contribuyendo a que los microorganismos presentes en esta zona sean menos atacados por compuestos tóxicos. Por otra parte, las bacterias aisladas de la región recto-anal están en contacto directo con sustancias derivadas del metabolismo que pueden llegar a ser tóxicas, incluso con compuestos como las sales biliares (Elkins, C. A., et al. 2002 y Thanassi, D. et al. 1997) que pueden llegar a ser altamente tóxicas para estas y que necesariamente pasan por esta región para ser excretadas. Es por ello que necesitan presentar mecanismos de defensa eficientes, versátiles y de amplio espectro tales como las bombas de expulsión para poder realizar un eflujo de estos compuestos fuera de ellas y procurar su supervivencia. Además, se sabe que en general las bacterias Gram negativas tienen mucha mayor resistencia a varios antisépticos, antibióticos, colorantes y detergentes que las bacterias Gram

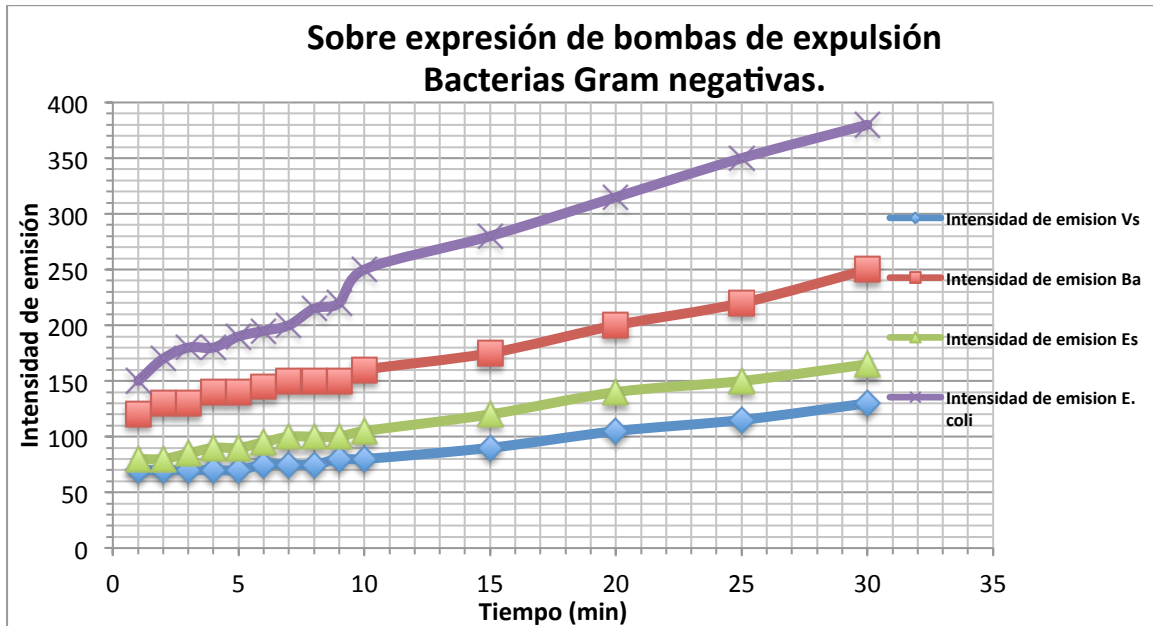
positivas. Esto es en parte debido a la efectividad de la membrana externa como barrera de protección (Yu, E., et al. 2003).

### Ensayo espectrofluorométrico para el análisis de la sobre expresión de bombas de expulsión.

Posteriormente a la prueba de tolerancia de bromuro de etidio se realizó un ensayo espectrofluorométrico con la adición del mismo compuesto, para analizar cuantitativamente la sobre expresión en las cepas seleccionadas. El bromuro de etidio es un agente intercalante que al estar unido a los ácidos nucleicos presenta una fluorescencia intensa, mientras que al estar de forma libre presenta una fluorescencia menor (Kaatz, G. W. et al 2000). Al agregar bromuro de etidio al medio de cultivo, este entrará a las células formando así un complejo con el DNA. Sin embargo, si las bacterias sobre expresan bombas de expulsión, podrán expulsar eficientemente a este compuesto, permitiendo su supervivencia.



Grafica 1. Ensayo espectrofluorométrico para las cepas Gram positivas, utilizando como control negativo a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Grafica 2. Ensayo espectrofluorométrico para las cepas Gram negativas, utilizando como control negativo a *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ATCC 53868.

Se utilizaron como control negativo las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ATCC 53868 para las cepas Gram positivas y Gram negativas respectivamente, las cuales son sensibles a todos los antibióticos.

Podemos observar en las gráficas 1 y 2 que tanto el 100% de las cepas Gram negativas como el 100% de las cepas Gram positivas se encuentran por debajo de la intensidad de emisión de los controles negativos, lo cual nos indica que todas están expulsando eficientemente al colorante tóxico muy probablemente por estar sobre expresando bombas de expulsión. Además se observa principalmente que en las cepas Gram positivas inicialmente existe un aumento rápido en la formación del complejo DNA-bromuro de etidio, mientras que en las cepas Gram negativas no ocurre. Quizá esto podría explicar porqué en la prueba de tolerancia al bromuro de etidio, las cepas Gram positivas crecieron a concentraciones bajas en comparación con las cepas Gram negativas

### Antibiograma (Método de Kirby – Bauer) para bacterias Gram negativas.

Antibiótico	Vs <sub>C</sub>	Vs <sub>24DNP</sub>	Vs <sub>OMP128/300</sub>	Ba <sub>C</sub>	Ba <sub>24DNP</sub>	Ba <sub>OMP128/300</sub>	Es <sub>C</sub>	Es <sub>24DNP</sub>	Es <sub>OMP128/300</sub>
<b>AK</b>	S	S	R/R	S	S	R/R	I	S	R/R
<b>AM</b>	R	R	R/R	R	R	R/R	R	R	R/R
<b>CB</b>	R	R	R/R	R	R	R/R	R	R	R/R
<b>CF</b>	R	R	R/R	R	R	R/R	R	R	R/R
<b>CFX</b>	R	S	R/R	R	S	R/R	R	S	R/R
<b>CPF</b>	R	S	R/I	S	S	S/S	I	R	I/I
<b>CL</b>	S	R	S/S	R	R	R/I	S	R	R/R
<b>GE</b>	S	S	I/S	R	S	R/R	S	S	R/I
<b>NET</b>	S	S	R/I	R	R	R/R	S	S	I/R
<b>NF</b>	S	S	S/S	R	S	S/S	S	S	S/I
<b>NOF</b>	I	I	S/S	S	I	S/S	S	R	I/S
<b>STX</b>	R	R	R/R	R	R	R/R	R	R	R/R

Cuadro 6. Cambios en la sensibilidad de las bacterias a diferentes antibióticos. Se presenta el diámetro del halo de inhibición en milímetros. A la base del medio (Mueller-Hinton) se le agregó una concentración de 2,4-DNP (0.003M) u omeprazol a dos concentraciones 128 y 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; posteriormente, se observaron las diferencias de crecimiento. Amikacina (AK; 30 microgramos), Ampicilina (AM; 10 microgramos), Carbencilina (CB; 100 microgramos), Cefalotina (CF; 30 microgramos), Cefotaxima (CFX; 5 microgramos), Ciprofloxacina (CPF; 5 microgramos), Cloranfenicol (CL; 30 microgramos), Gentamicina (GE; 10 microgramos), Netilmicina (NET; 30 microgramos), Nitrofurantoina (NF; 300 microgramos), Norfloxacina (NOF; 10 microgramos) y Sulfametoxazol/trimetropim (STX; 25 microgramos). R; bacteria resistente; no presenta halo de inhibición. S; bacteria sensible, la cual presenta un diámetro de halo de inhibición mayor a 30 mm. R: resistencia, I: resistencia o sensibilidad intermedia y S: sensible.

### Antibiograma (Método de Kirby – Bauer) para bacterias Gram positivas.

Antibiótico	WT5 <sub>C</sub>	WT5 <sub>24DNP</sub>	WT5 <sub>OMP</sub>		T10 <sub>C</sub>		T10 <sub>24DNP</sub>		T10 <sub>OMP</sub>		A5 <sub>C</sub>	A5 <sub>24DNP</sub>	A5 <sub>OMP</sub>	
			128/300				128/300						128/300	
AM	R	R	R / R	R	R	R / R	R	R	R / R	R	R	R / R		
CF	R	R	S / S	I	R	S / S	R	R	S / S	R	R	I / S		
CFX	R	R	R / R	R	R	S / S	R	R	S / S	R	R	S / S		
DC	R	R	----	R	R	----	R	R	----	R	R	----		
CPF	I	R	S / I	I	I	S / S	R	I	S / S	R	I	S / S		
CLM	S	S	R / I	I	I	I / S	S	R	S / S	S	R	S / S		
GE	S	S	R / R	S	S	I / I	R	R	I / I	R	R	I / I		
E	S	S	I / S	S	S	S / S	S	R	S / S	S	R	S / S		
STX	S	I	----	S	S	----	I	R	----	I	R	----		
PE	R	R	R / R	R	R	R / R	R	R	R / R	R	R	R / R		
VA	R	S	R / R	R	R	R / S	S	R	R / S	S	R	R / R		
TE	I	S	S / S	I	S	S / S	I	R	S / S	I	R	S / S		

Cuadro 7. Cambios en la sensibilidad de las bacterias a diferentes antibióticos. A la base del medio (Mueller-Hinton) se le agregó una concentración de 2,4-DNP (0.0005M) u omeprazol a dos concentraciones 128 y 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , posteriormente se observaron las diferencias de crecimiento. Las mediciones representan el diámetro del halo de inhibición en milímetros. Ampicilina (AM; 10 microgramos), Cefalotina (CF; 30 microgramos), Cefotaxima (CFX; 30 microgramos), Ciprofloxacina (CPF; 5 microgramos), Clindamicina (CLM; 30 microgramos), Dicloxacilina (DC; 1 microgramo), Eritromicina (E; 15 microgramos), Gentamicina (GE; 10 microgramos), Penicilina (PE; 10U), Tetraciclina (TE; 30 microgramos), Sulfometoxasol/trimetoprim (STX; 25 microgramos), Vancomicina (VA 30 microgramos). R; bacteria resistente, la cual no presenta ningún halo de inhibición. S; bacteria sensible, la cual presenta un diámetro de halo de inhibición mayor a 30 mm. R: resistencia, I: resistencia o sensibilidad intermedia y S: sensible.

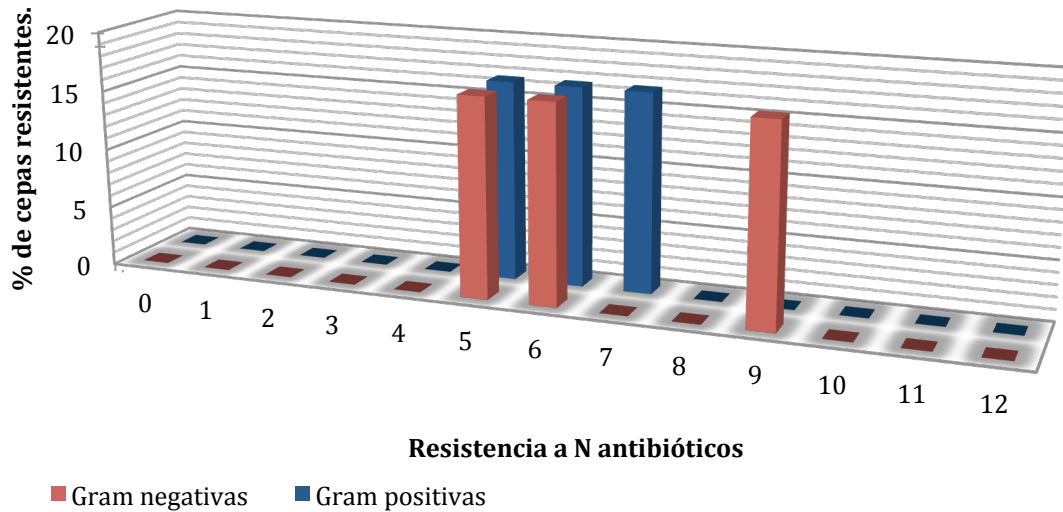
Mediante el método de Kirby-Bauer se analizó la sensibilidad a antibióticos de las 6 cepas trabajadas, también con la adición de diferentes concentraciones de 2,4-DNP y omeprazol.

La concentración de 2,4-DNP agregada previamente al medio fue la CMI y se determinó mediante una curva de tolerancia a diferentes concentraciones, la cual varió para las bacterias Gram negativas (0.003M) y Gram positivas (0.0005M). De la misma manera, se realizó una curva de crecimiento a diferentes concentraciones (5, 10, 50, 100, 128, 200 y 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de omeprazol. Sin embargo, todas las cepas trabajadas resistieron la concentración más alta estudiada. Dichas concentraciones fueron tomadas de Ni, W. et al. 2014, Vidailiac, C. et al. 2007 y Jonkers, D. et al. 1996. Sin embargo estos autores no mencionan que el omeprazol tenga un efecto *per se* el cual afecte el crecimiento de las bacterias como es el caso con el 2,4-DNP. Lo que sí mencionan es que este tiene un efecto sinérgico con los antibióticos de tal manera que inhibe el crecimiento de las bacterias, por lo cual para este experimento se tomaron dos concentraciones: 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para determinar si un aumento en la concentración de omeprazol ejercía un efecto más potente para inhibir el crecimiento bacteriano.

Debido a que este es un método de difusión, para la interpretación de sensibilidad o resistencia se utilizaron las Normas CLSI – NCCLS.

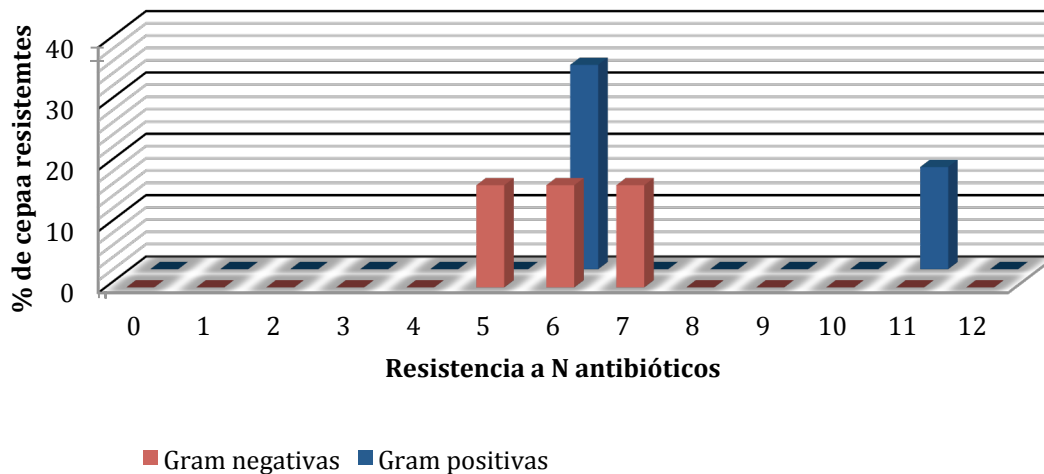
Mediante las gráficas 3 – 10 podemos observar la variación en porcentaje que se presenta de la resistencia a los antibióticos y si se presentó algún efecto con los compuestos utilizados sobre las cepas estudiadas en su crecimiento.

## Resistencia bacteriana



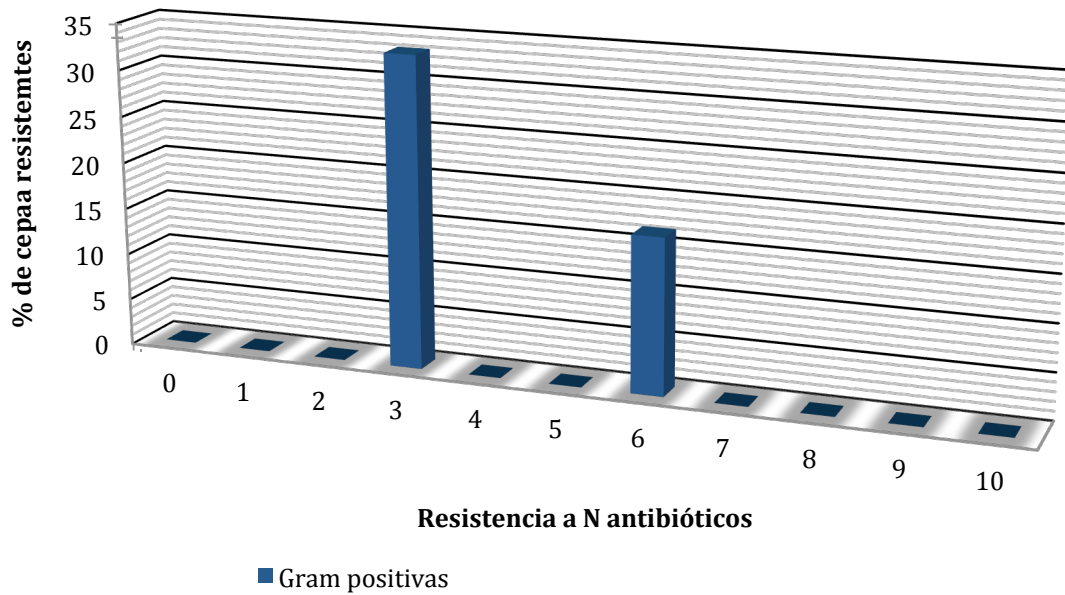
Grafica 3. Porcentaje de resistencia mostrado por las cepas estudiadas a diferente tipo de antibióticos.

## Resistencia bacteriana (24DNP)



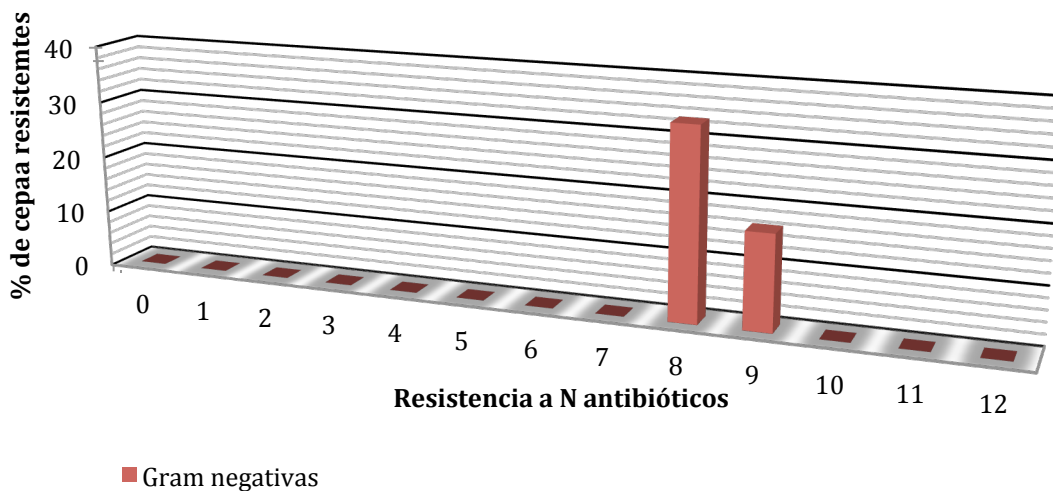
Grafica 4. Porcentaje de resistencia mostrado por las cepas estudiadas a diferentes antibióticos en presencia de 2,4-DNP a una concentración de 0.003M y 0.0005M para bacterias Gram negativas y positivas respectivamente.

## Resistencia bacteriana (OMP, 128)



Grafica 5. Porcentaje de resistencia mostrado por las cepas Gram positivas estudiadas a diferentes antibióticos en presencia de omeprazol a una concentración de  $128\mu\text{g}/\text{mL}$ .

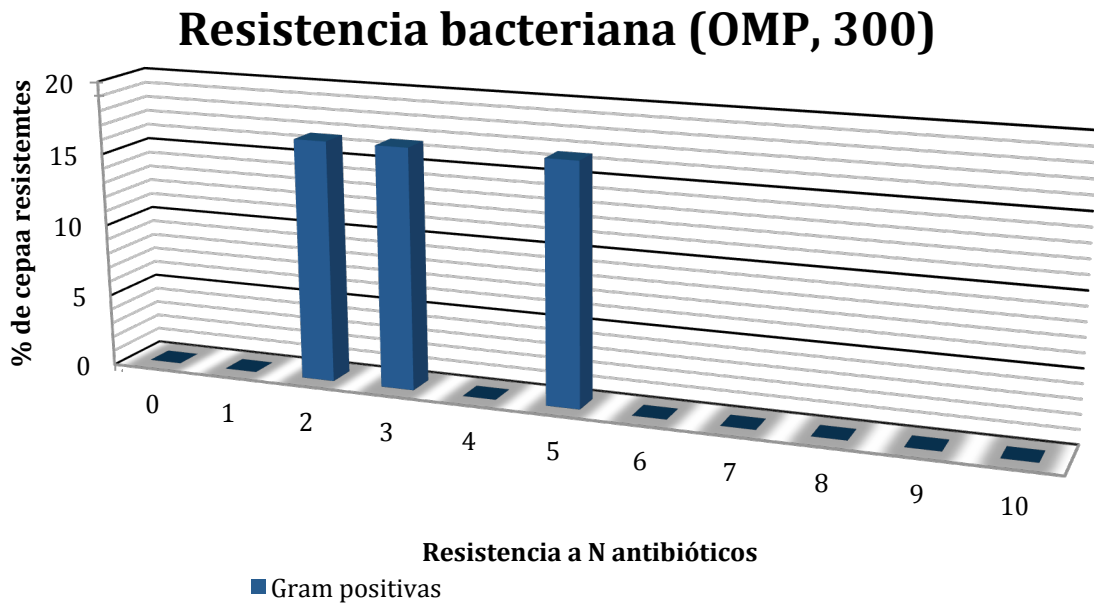
## Resistencia bacteriana (OMP, 128)



Grafica 6. Porcentaje de resistencia mostrado por las cepas Gram negativas estudiadas a diferente tipo de antibióticos en presencia de omeprazol a una concentración de  $128\mu\text{g}/\text{mL}$ .

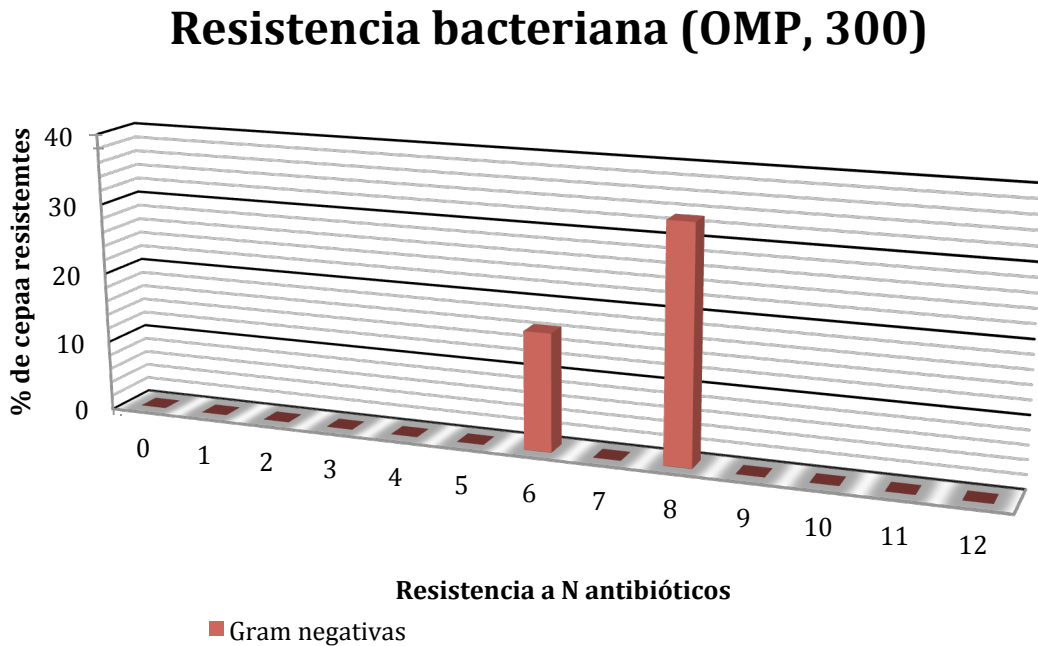


□

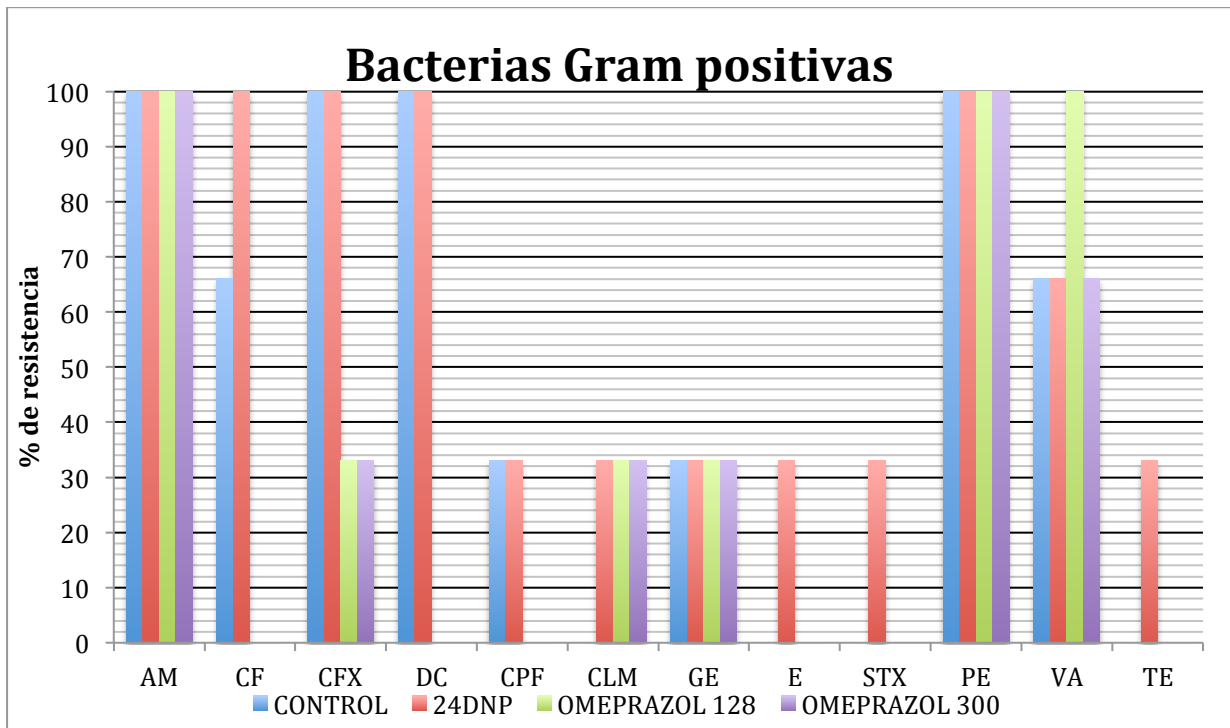


Grafica 7. Porcentaje de resistencia mostrado por las cepas Gram positivas estudiadas a diferentes antibióticos en presencia de omeprazol a una concentración de  $300\mu\text{g}/\text{mL}$ .

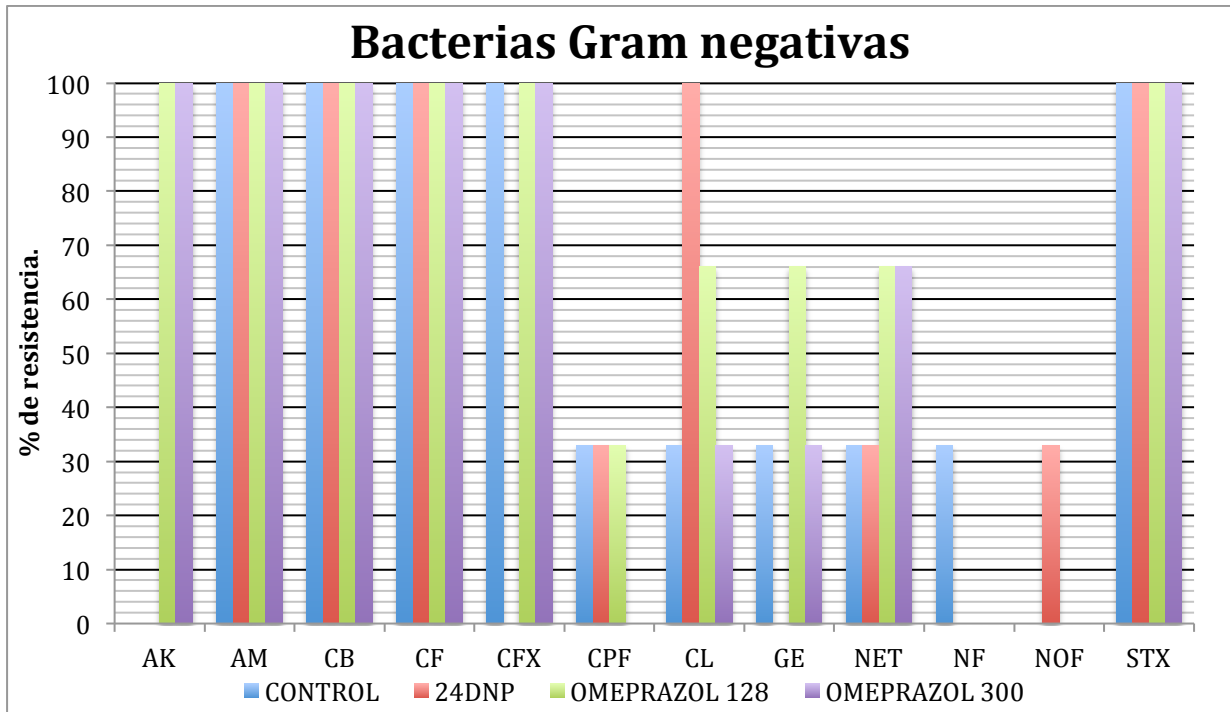
□



Grafica 8. Porcentaje de resistencia mostrado por las cepas Gram negativas estudiadas a diferentes antibióticos en presencia de omeprazol a una concentración de  $300\mu\text{g}/\text{mL}$ .



Grafica 9. Variación del porcentaje de resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias Gram positivas con la adición de 2,4-DNP u omeprazol con respecto al control.



Grafica 10. Variación del porcentaje de resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias Gram negativas con la adición de 2,4-DNP u omeprazol con respecto al control.

## Antibiogramas (método de Kirby – Bauer).

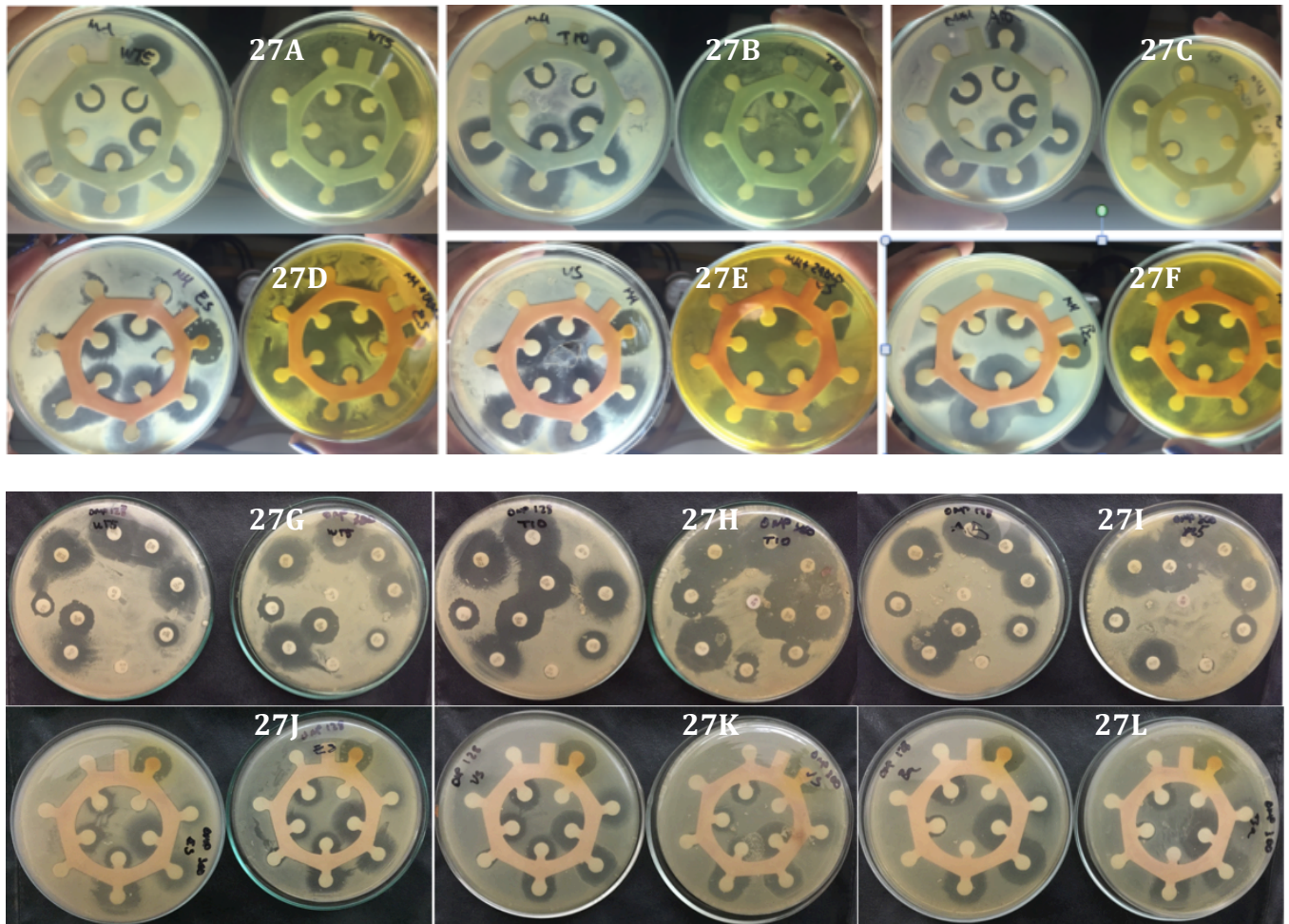


Figura 27. Antibiogramas (método de Kirby-Bauer) control (caja lado izquierdo) y tratamiento con 2,4-DNP (caja lado derecho), en cada panel desde 27A hasta 27F. Cepa WT5 (27A), cepa T10 (27B), cepa A5 (27C), cepa Es (27D), cepa Vs (27E), y cepa Ba (27F). Del panel 27G a 27L se presentan los tratamientos con omeprazol a dos diferentes concentraciones:  $128 \mu\text{g}/\text{mL}$  caja del lado derecho y  $300 \mu\text{g}/\text{mL}$  caja del lado izquierdo. Cepa WT5 (27G), cepa T10 (27H), cepa A5 (27I), cepa Es (27J), cepa Vs (27K), y cepa Ba (27L).

La gráfica 3 nos muestra el comportamiento inicial de las cepas mostrando que todas son resistentes a al menos 5 antibióticos. En contraste, la gráfica 4 nos muestra el efecto que tuvo el 2,4-DNP sobre las cepas, donde aparentemente se observa que las bacterias Gram positivas tuvieron un aumento en la resistencia a

por lo menos 6 antibióticos mientras que las bacterias Gram negativas tuvieron un comportamiento casi similar al que se observa en el control con resistencia a 5 antibióticos.

En las gráficas 5 a 8 se muestra el efecto que tuvo la adición de dos concentraciones de omeprazol y su efecto sobre la resistencia a los antibióticos. Se observa que para las bacterias Gram positivas una concentración de  $128 \mu\text{g}/\text{mL}$  disminuyó la resistencia de estas a al menos 3 antibióticos mientras que para las bacterias Gram negativas aumentó la resistencia con respecto al control a al menos 8 antibióticos. Para la concentración de  $300 \mu\text{g}/\text{mL}$  se observa que las bacterias Gram positivas disminuyeron su resistencia a 2 antibióticos mientras que en las bacterias Gram negativas aumentó la resistencia a 6 antibióticos, en ambos casos respecto al control.

Las gráficas 9 y 10 muestran la variación del porcentaje de resistencia a los antibióticos de las cepas Gram positivas y Gram negativas con la adición de los diferentes compuestos.

El 2,4-DNP ha sido ampliamente estudiado como desacoplante del gradiente de protones de la cadena respiratoria, el cual es necesario para el funcionamiento de la ATPasa y generación de ATP, causando serias deficiencias en el metabolismo celular. Como se mencionó anteriormente, las mayoría de las bombas de expulsión utilizan un gradiente de protones para llevar a cabo su función de flujo. Por lo tanto, al agregar 2,4-DNP al medio, este tendrá un efecto desacoplando el gradiente de protones que utilizan las bacterias para realizar el antiporte a través de las bombas de expulsión, pudiendo ocasionar que los antibióticos no sean expulsados fuera de la célula y provocando que estos tengan el efecto deseado,

provocando así la muerte celular. Por otra parte quizá podría también afectar a las bombas de expulsión de transporte activo primario ya que al haber también un déficit en la producción de ATP debido a la función más estudiada del 24DNP, las bombas de expulsión primarias no podrían llevar a cabo su función.

El efecto mostrado por el 2,4-DNP nos muestra resultados sorprendentes, ya que en algunos casos aparentemente se observa un aumento en la sensibilidad del microorganismo al antibiótico, es decir, que incrementa el halo de inhibición como en el caso de la cepa Vs con los antibióticos CFX y CPF, en la cepa Ba con los antibióticos CFX, GE y NF, en la cepa Es con los antibióticos AK y CFX, en la cepa WT5 con los antibióticos VA y TE, en la cepa T10 con el antibiótico TE y en la cepa A5 con el antibiótico CPF. Esto puede explicarse con base al efecto que puede provocar el desacoplamiento del gradiente de protones en las bombas de expulsión de las bacterias como se explica líneas arriba, dando como resultado una disfunción de estas y causando la inhibición en el crecimiento del microorganismo.

Por otra parte se observa que algunas cepas adquieren cierta resistencia aparente a los antibióticos con respecto a las células control mostrando un decremento del halo de inhibición como se observa en la cepa Vs con el antibiótico CL, en la cepa Ba con el antibiótico NOF, en la cepa Es con los antibióticos CPF, CL y NOF, en la cepa WT5 con los antibióticos CPF y STX, en la cepa T10 con el antibiótico CF y en la cepa A5 con los antibióticos CLM, E, STX, VA y TE. No tenemos una explicación definitiva a este fenómeno en este momento; sin embargo, se ha reportado que existen bacterias las cuales tienen un regulador molecular (*MarR*, *multiple antibiotic resistance regulator*) que les permite inducir la transcripción de

genes en presencia de algunos compuestos (entre los que se encuentran los derivados fenólicos, tales como el 2,4-DNP) con lo cual se ocasiona un incremento en la resistencia bacteriana al antibiótico independiente de las bombas de expulsión (Razieh, P., Nasim, J. 2013). Sin embargo, aunque este mecanismo de detoxificación ha sido más estudiado en bacterias Gram negativas, en las Gram positivas observamos un efecto análogo, lo cual nos sugiere la presencia de algún gen o mecanismo regulador similar al que poseen las bacterias Gram negativas como mecanismo de detoxificación. Tal podría ser el caso del gen regulador *mgr* el cual se ha demostrado que controla la expresión de múltiples genes (Luong, T. T, et al. 2003) y tiene similitud con el regulador MarR (Alekhshun, M. N. & Levy, S. B. 1999 y Martin, R. G. & Rosner, J. L. 1995) ya que contiene un solo gen: *mgrA* (Luong, T. T, et al. 2003) y se ha demostrado que regula negativamente la expresión de algunas bombas de expulsión (Truong-Bolduc, Q. C. et al 2005). Además del incremento y decremento del halo de inhibición, se observa que con algunos otros antibióticos tanto en el control como en el experimento con 2,4-DNP no se presenta cambio alguno en el fenotipo de resistencia.

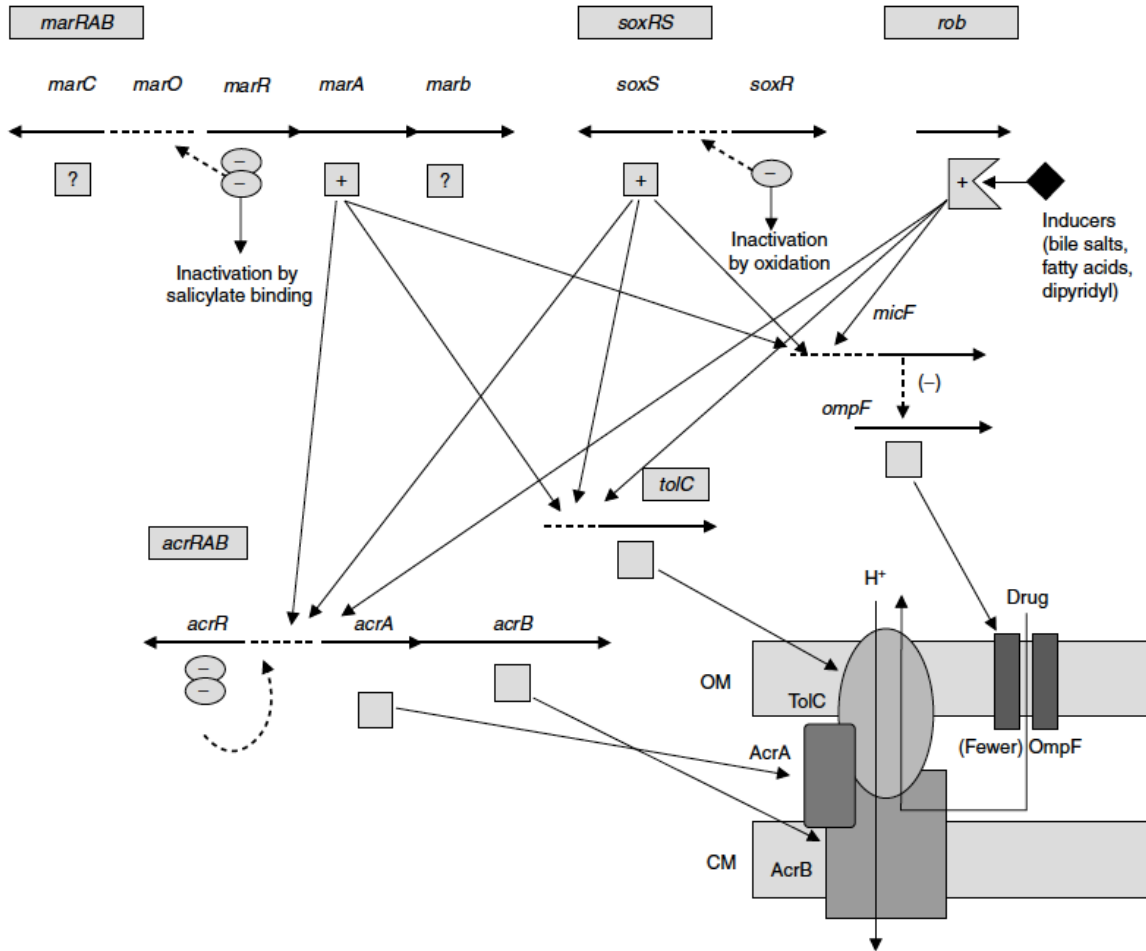


Figura 28. Cascada de activación del regulón *mar* para la expresión de genes de bombas de expulsión mostrando específicamente su efecto sobre la bomba de expulsión AcrAB-TolC. Tomado de Li, X. Z y Nikaido, H. 2004.

Para el caso del omeprazol ocurre un efecto similar, ya que se sabe que este compuesto es un inhibidor de la bomba de protones  $H^+/K^+$ -ATPasa presente en las células gástricas por lo que inhibe el antiporte de potasio y protones causando un decremento del ácido producido en el estómago. De igual manera, este compuesto se utilizó para observar su efecto sobre las bombas de expulsión al unirse a estas e inhibirlas, provocando así que las células no puedan utilizar el gradiente de protones y el efecto del antibiótico sea el esperado, provocando la muerte celular.

Al igual que con el 2,4-DNP el omeprazol nos muestra diferentes resultados de acuerdo a la concentración que se haya utilizado.

Para la concentración de  $128 \mu\text{g}/\text{mL}$  se puede ver que con algunos antibióticos se observa un aumento en la sensibilidad del microorganismo, es decir, se incrementa el halo de inhibición como en el caso de la cepa Vs con el antibiótico NOF, en la cepa Ba con el antibiótico NF, la cepa Es no presenta este efecto, en la cepa WT5 con los antibióticos CF, CPF y TE, en la cepa T10 con los antibióticos CF, CPF, y TE, y en la cepa A5 con los antibióticos CF, CFX, CPF, GE y TE. Por otra parte, se observa que las bacterias adquieren cierta resistencia aparente al antibiótico a esta concentración de omeprazol con respecto a las células control mostrando un decremento del halo de inhibición. Tal es el caso de la cepa Vs con los antibióticos AK, GE y NET, de la cepa Ba con el antibiótico AK, de la cepa Es con los antibióticos AK, CL, GE, NET y NOF, de la cepa WT5 con los antibióticos CLM, GE y E, de la cepa T10 con el antibiótico GE y de la cepa A5 con el antibiótico VA. Además del incremento y decremento del halo de inhibición, se observa que con algunos otros antibióticos las células en presencia de omeprazol al igual que con el 2,4-DNP no se presentan cambio alguno en el fenotipo de resistencia.

Para la concentración de  $300 \mu\text{g}/\text{mL}$  se puede ver que con algunos antibióticos se muestra un aumento en la sensibilidad del microorganismo, es decir que incrementa el halo de inhibición. Tal es el caso de la cepa Vs con los antibióticos CPF y NOF, en la cepa Ba con los antibióticos CL y NF, en la cepa Es no se presenta este efecto, en la cepa WT5 con los antibióticos CF y TE, en la cepa T10 con los antibióticos CF, CFX, CPF, CLM, , VA y TE y por último la cepa A5 con los



antibióticos CF, CFX, CPF, GE y TE. Por otra parte, se observa que las bacterias parecen adquirir cierta resistencia al antibiótico a esta concentración de omeprazol con respecto a las células control mostrando un decremento del halo de inhibición. Tal es el caso de la cepa Vs con los antibióticos AK y NET, en la cepa Ba con el antibiótico AK, en la cepa Es con los antibióticos CL, GE, NET y NF, en la cepa WT5 con los antibióticos CLM, GE, en la cepa T10 con el antibiótico GE, y con la cepa A5 con el antibiótico VA.

Además del incremento y decremento del halo de inhibición, se observa que con algunos otros antibióticos las células en presencia de omeprazol al igual que con el 24DNP no presentan cambio alguno en el fenotipo de resistencia.

De estos resultados podemos observar que el omeprazol aumenta la sensibilidad a los antibióticos principalmente de las cepas Gram positivas lo que concuerda con lo dicho por Jonkers, D. *et al.* (1996) además de que en algunas cepas la sensibilidad a los antibióticos se incrementa de forma proporcional al aumento de la concentración de omeprazol. Sin embargo, esto no sucede en todos los casos.

En las cepas en las que se observa un aumento en la sensibilidad debido al uso del omeprazol, es decir, un incremento en el halo de inhibición, ello puede ser debido a que exista cierta similitud entre las bombas de expulsión y la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, lo cual provocaría una inhibición de esta no permitiendo el antiporte de protones por el antibiótico y provocando disfunción de la bacteria tal que la lleva a su muerte. Sin embargo, no hay reportes en los que se especifique el mecanismo de acción preciso del omeprazol y su efecto sobre la sensibilidad bacteriana.

Para las cepas en las que se observa un aumento en la resistencia, es decir, un decremento del halo de inhibición no tenemos una respuesta clara, sin embargo

podría tratarse de un mecanismo similar al que sucede con la adición de 2,4-DNP tanto para bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas.

Para los antibiogramas realizados, tanto para el control como 2,4-DNP y omeprazol se utilizaron antibióticos de diferentes familias, lo cual nos sugiere que el resistoma bacteriano de nuestras cepas analizadas es muy amplio y variado y que quizá estas pudieran tener activos los tres tipos de mecanismo de defensa antes mencionados, los cuales podrían estar codificados dentro del DNA cromosómico o plasmídico. Además, esta resistencia puede ser debida también a que quizá los antibióticos de cada familia comparten ciertas estructuras base parecidas entre sí, lo cual hace que puedan ser más fáciles de reconocer por los diferentes mecanismos de defensa y de esta manera ser eliminados más eficientemente.

### **Extracción de DNA y estudio de los genes *acrB*, *marA* y *norA* mediante la técnica de PCR**

Con el objeto de estudiar la posible amplificación génica de los genes *acrB* y *norA* que codifican para bombas de expulsión así como el regulón *marA* se realizó la extracción de DNA de las cepas seleccionadas. Dichos genes codifican para las bombas de expulsión más frecuentemente reportadas tanto en bacterias Gram positivas como negativas. Para el caso de las bacterias Gram negativas (Nikaido, H. 1996, Yu, E. W. *et al.* 2003 y Li, X. & Nikaido, H. 2004) debido a que todas eran de la especie *E. coli* se decidió estudiar una región del gen de la bomba de expulsión AcrB (ver anexo I). Para las bacterias Gram positivas (Schlindler, B. D. & Kaatz, G. W. 2016, Handzlik, H. 2013 y Li, X. & Nikaido, H. 2004) debido a que

todas eran de la especie *S. aureus* se decidió estudiar una región del gen de la bomba de expulsión NorA (ver anexo I). Además, para todas las cepas (tanto Gram positivas como negativas) se trató de explorar una secuencia del regulón *marA* para estudiar su posible amplificación en las bacterias Gram negativas y tratar de identificar a un posible homólogo en las bacterias Gram positivas. El estudio se llevó a cabo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

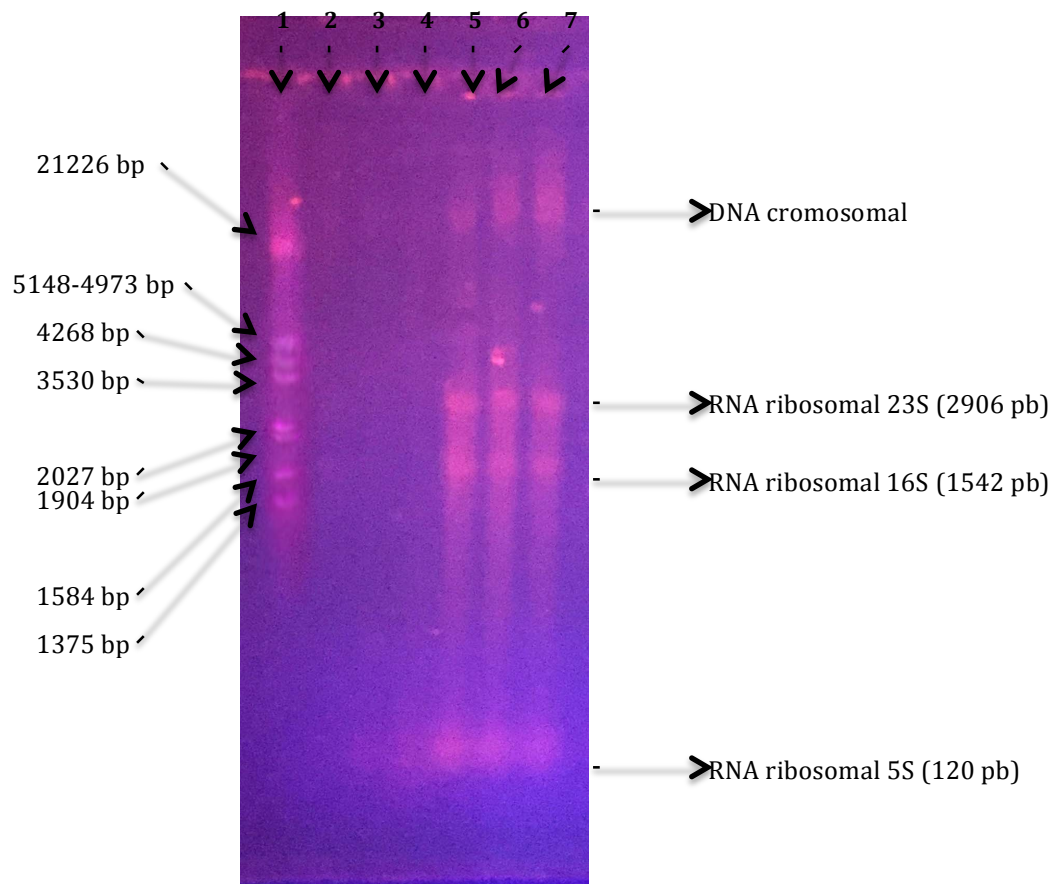


Figura 29. Electroforesis de DNA en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio y revelado en luz UV. Carril 1: DNA del fago lambda cortado con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI. Carril 2: DNA cepa A5. Carril 3: cepa WT5. Carril 4: cepa T10. Carril 5: cepa Vs. Carril 6: cepa Es. Carril 7: cepa Ba.

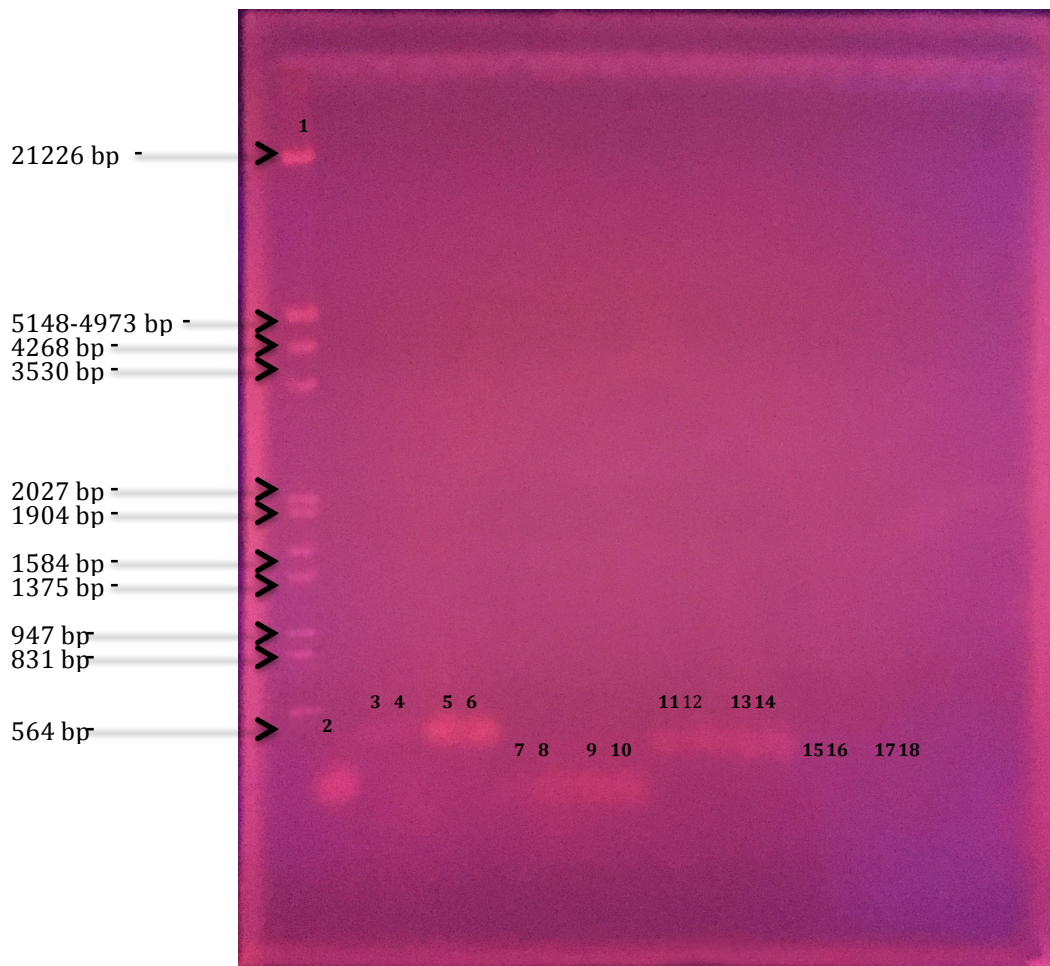


Figura 30. Técnica de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio y revelado con luz UV.

Carril 1: DNA del fago lambda cortado con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI. Carril 2: Control positivo (323 pb) Carril 3, 4, 5 y 6: amplificación del gen *acrB* para las cepas *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ATCC 53868, Vs, Es y Ba respectivamente. Carril 7, 8, 9 y 10: amplificación del gen *marA* para las cepas *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ATCC 53868, Vs, Es y Ba respectivamente. Carril 11, 12, 13 y 14: amplificación del gen *norA* para las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, WT5, T10 y A5 respectivamente. Carril 15, 16, 17 y 18: amplificación del gen *marA* para las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, WT5, T10 y A5.

En la figura 29 se observa el resultado de la extracción de DNA de las cepas utilizadas mediante el método de Cheng, H. R. & Jiang, N. (Cheng, H. R. & Jiang, N., 2006) con modificaciones para su posterior observación, verificar su integridad

y conocer su concentración, el cual posteriormente fue utilizado para el estudio de los genes *acrB*, *marA* y *norA* mediante la técnica de PCR.

En la figura 30 se observa el resultado del estudio de los genes *acrB*, *marA* y *norA* mediante la técnica de PCR. En el caso de las bacterias Gram negativas, para el gen *acrB* en las cepas Es y Ba se observó claramente una fluorescencia de mayor intensidad que en el control (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ATCC 53868), mientras que para la cepa Vs la fluorescencia fue casi igual que en el control. Por lo cual quizá exista una mayor amplificación del gen en las cepas Es y Ba con respecto al control que en la cepa Vs ya que al parecer la expresión en esta cepa es similar al control.

Para el caso del gen *marA* para las bacterias Gram negativas los resultados parecen ser similares a lo mencionado anteriormente con el gen *acrB*, en donde las cepas Es y Ba presentaron una fluorescencia mayor con respecto al control, mientras que la cepa Vs presentó una fluorescencia mayor al control pero menor que las otras dos cepas. Por lo que se sugiere que las cepas Vs, Es y Ba podrían haber amplificado este gen.

Los efectos observados para el gen *acrB* y *marA* pueden ser explicados mediante la duplicación y amplificación génica, la cuál es un proceso adaptativo importante donde se ha demostrado que se amplifican genes que confieren resistencia para asegurar la sobrevivencia de la bacteria (como se puede ejemplificar en la figura 31) entre los que se encuentran las bombas de expulsión (Sandegren, L. & Andersson, D. I., 2009), de esta manera al realizar el análisis por medio de la técnica de PCR se sugiere que existe una mayor amplificación de los genes por parte de las cepas estudiadas con respecto al control por el mecanismo de

duplicación y amplificación génica. Sin embargo, para corroborar esto se debe realizar un estudio de secuenciación, con lo cual se podría asegurar si el mecanismo anteriormente mencionado es el que presentan las cepas estudiadas.

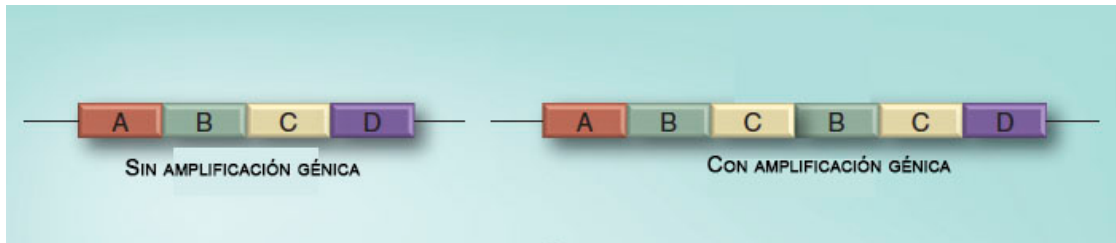


Figura 31. Esquematación de la duplicación y amplificación génica. Tomado de Elliott, K. T. *et al.* 2013.

Para el caso del gen *norA* se observa que todas las cepas incluyendo al control *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 presentaron la misma intensidad de fluorescencia, lo cual podría indicar que el gen está amplificado tanto en el control como en las cepas estudiadas, por lo que tal vez en el ensayo espectrofluorométrico la intensidad de emisión menor que presentaron estas con respecto al control y la resistencia a diferentes antibióticos se puede deber a la presencia de expresión de otro tipo de familias de bombas de expulsión.

Finalmente, para el gen *marA* en el caso de las bacterias Gram positivas, no se observó ninguna fluorescencia ni del control ni de las cepas estudiadas, lo cual nos indica que los primers no encontraron secuencias similares a este gen en dichos microorganismos. Este ensayo fue realizado ya que se conoce la presencia de un regulón (*mgr*) en las bacterias Gram positivas el cual es homólogo al regulón *mar*. Pensando en esta relación, se trató de observar si los primers diseñados para el regulón *mar* podían amplificar alguna secuencia potencialmente similar presente en el regulón *mgr*. Sin embargo, esto no sucedió así.

## CONCLUSIONES

Se estudiaron 6 cepas en total: 3 cepas Gram positivas provenientes de región ocular, resultando ser de la especie *Staphylococcus aureus* y 3 cepas Gram negativas provenientes de la región recto-anal, resultando ser de la especie *Escherichia coli*. Además, todas las cepas estudiadas presentan un fenotipo de multirresistencia a los antibióticos. Los resultados experimentales sugieren que sobre expresan bombas de expulsión debido a su tolerancia a diferentes concentraciones de bromuro de etidio además de los ensayos espectrofluorométricos en los que la intensidad de emisión está por debajo de las cepas control, las cuáles son sensibles a todos los antibióticos.

De acuerdo a los resultados obtenidos con los antibiogramas que se realizaron con 2,4-DNP y omeprazol se observó una variación en la resistencia a antibióticos por parte de las cepas estudiadas.

Sin embargo, es posible sugerir que a pesar de que el 2,4-DNP es un compuesto desacoplante de la cadena respiratoria muy estudiado desde hace muchos años dentro de este contexto, así como también el omeprazol es bien conocido por inhibir la bomba de protones H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa y de que la mayoría de las bombas de expulsión son sistemas de transporte secundario dependiente del gradiente de protones en las bacterias, el efecto del 2,4-DNP y omeprazol sobre ellas es mucho más complejo de lo inicialmente contemplado lo cuál muestra que probablemente su presencia alteró a la fisiología celular en múltiples puntos, posiblemente a través de los regulones *mar* y *mgr* para bacterias Gram negativas y positivas, respectivamente.

Finalmente un estudio de los genes mediante la técnica de PCR nos sugiere que dos de las tres cepas Gram negativas (Es y Ba) presentan una posible duplicación y amplificación génica para el gen *acrB* y las tres cepas Gram negativas (Vs, Es y Ba) presentan una posible duplicación y amplificación génica para el gen *marA*. Este fenómeno les permitiría sobre expresar a las bombas de expulsión para las que codifican. Para las cepas Gram positivas no se observa este efecto para el gen estudiado (*norA*) ya que su expresión parece ser semejante al del control en todos los casos; esto podría indicar que no presentan sobre expresión de este tipo de bomba de expulsión. Sin embargo no debemos olvidar que existen varias familias de bombas de expulsión y que pueden estar presentes en una célula proporcionando a dicha célula el fenotipo de multirresistencia mediante la sobre expresión de esos otros tipos de bombas de expulsión.

Se concluye que a pesar de provenir de sitios anatómicos tan diferentes, en los mismos se encuentran bacterias multirresistentes a los antibióticos que posiblemente presentan sobre expresión de bombas de expulsión. Sin embargo parece ser que existe una mayor proporción de resistencia a antibióticos por parte de las muestras tomadas de la región recto-anal.



## ANEXO I.

Diseño de primers para PCR de las bombas de expulsión mas representativas en la literatura de las cepas utilizadas.

- **Secuencia del gen de la bomba de expulsión AcrB en *E. coli*:**

```
1 atgcctaatt tctttatoga tgcgccgatt tttgctgagg tgatcgccat tatcatcatg
61 ttggcagggg ggctggcgat cctcaaactg ccggtggcgc aatatoctac gattgcaccg
121 ccggcagtaa cgatctccgc ctccctacccc ggcgctgatg cgaaaacagt gcaggacacg
181 gtgacacagg ttatcgaaca gaatatgaac ggtatcgata acctgatgta catgtcctct
241 aacagtgact ccacgggtac cgtgcagatc accctgacct ttgagtctgg tactgatgcy
301 gatatcgcg aggttcagggt gcagaacaaa ctgcagctgg cgatgccgtt gctgccgcaa
361 gaagttcagc agcaaggggt gagcgttgag aatcatcca gcagcttccct gatggttgtc
421 ggcgttatca acaccgatgg caccatgacg caggaggata tctccgacta cgtggcggcg
481 aatatgaaag atgccatcag ccgtacgctg ggcgtgggtg atgttcagtt gttcggttca
541 cagtacgca tgcgtatctg gatgaacccg aatgagctga acaaattcca gctaaccgcy
601 gttgatgtca ttaccgcat caaacgcag aacgcccagg ttgcyggcgg taagctcgtt
661 ggtacgccgc cggtgaaagg ccaacagctt aacgcctcta ttattgctca gacgcgtctg
721 acctctactg aagagttcgg caaaatcctg ctgaaagtga atcaggatgg ttcccgcytg
781 ctgctgcytg acgtcgcgaa gattgagctg ggtggtgaga actacgacat catcgcagag
841 tttaacggcc aaccgcyctt cggctcgggg atcaagctgg cgaccggtgc aaacgcgcyt
901 gataccgctg cggcaatccg tgctgaactg gcgaagatgg aaccgcttct cccgctcgggt
961 ctgaaaattg tttaccata cgacaccacg ccgctcgtga aaatctctat tcacgaagtg
1021 gttaaaacgc tggtcgaagc gatcatcctc gtgttctcgg ttatgtatct gttcctgcag
1081 aacttccgcy cgacgttgat tccgaccatt gccgtaccgg tggattgct cgggaccttt
1141 gccgctcctg ccgcctttgg cttctcgata aacacgctaa caatgctcgg gatggtgctc
1201 gccatcggcc tgttggtgga tgacgccatc gttgtggtag aaaaagttga gcgtggtatg
1261 gcggaagaag gtttgccgcy aaaagaagct acccgtaagt cgatggggca gattcagggc
1321 gctcgtgcyg gtatcgcgat ggtactgctg ccggtattcg taccgatggc cttccttggc
1381 ggttctactg gtgctatcta tgcgtagttc tctattacca ttgtttcagc aatggcgcgtg
1441 tccggtactg tggcgttgat cctgactoca gctctttgtg ccaccatgct gaaaccgatt
1501 gccaaagcgc atcacgggga aggtaaaaaa ggcttcttcg gctggtttaa ccgatgctt
1561 gagaagagca cgcaccacta caccgacagc gtaggcggta ttctgcgcag tacggggcgt
1621 tacctggtgc tgtatctgat catcgtggtc ggcattggcct atctgcttca gctgctgcca
1681 agctccttct tgcagatga gaccacgggc gtgtttatga ccattggttca gctgccagca
1741 ggtgcaacgc aggaacgtac acagaaagtg ctcaatgagg taacgcatta ctatctgacc
1801 aaagaaaaga acaacgttga gtcggtgctc gccgttaacg gcttcggctt tgcgggacgt
1861 ggtcagaata ccggtattgc gttcgtttcc ttgaaaggact gggccgatcg tccgggcyga
1921 gaaaacaaag ttgaagcgtat taccatgcyt gcaacacgcg ctttctcgca aatcaaagat
1981 gcgctggttt tcgcctttaa cctgcccoca atcgtggaac tgggtactgc aaccgcyctt
2041 gactttgagc tgattgacca ggtcggcctt ggtcacgaaa aactgactca ggcgcytaac
2101 cagttgcttg cagaagcagc gaagcaccct gatatggtga ccagcgtacg tccaaacggt
2161 ctggaagata ccccgcygtt taagattgat atcgcaccag aaaaagcgcg ggcgctgggt
2221 gtttctatca acgacattaa caccactctg ggcgctgat gggcggcag ctatgtgaac
2281 gactttatcg accgcygtcg tgtgaagaaa gtttatgtca tgtcagaagc gaaataccgt
2341 atcgtccgcy atgatatcgg cgaactggtat gttcgtgctg ctgatggtca gatggtgcca
2401 ttctcggcgt tctctcttcc tegtgggag tacggttcgc cgcgtctgga acgttacaac
2461 ggcctgccat ccatggaat cttaggccag gcggcaccgg gtaaaagtac cggatgaagca
2521 atggagctga tggaaacact ggcgagcaaa ctgcctaccg gtgttggtca tgactggacg
2581 gggatgtcct atcaggaacg tctctccggc aaccaggcac ctactctgta cgcgatttcg
2641 ttgattgctg tgttctctgt tctggcggcg ctgtacgaga gctggtcgtat tccgttctcc
2701 gttatgctg tgcgttcgct gggggttatc ggtgcgttgc tggctgccac cttccggtggc
2761 ctgaccaatg acgtttactt ccaggtaggc ctgctcacia ccattgggtt gtcggcgaag
2821 aacgcgatcc ttatcgtcga attcgcacia gacttgatgg ataaagaagg taaaggtctg
2881 attgaagcga cgcttgatgc ggtgcggatg cgtttacgct cgatcctgat gacctcgtg
2941 gcgtttatcc tccgcyttat gccgctggtt atcagtaact gtgctggttc cggcgcgcag
3001 aacgcagtag gtaccggtgt aatggcggcg atggtgaccg caacggtact ggcaatcttc
3061 ttcggtccgcy tattctttgt ggtggttcgc ccgccttta gccgcaagaa tgaagatata
3121 gagcacagcc atactgtcga tcatcattga
```

acrB-F 1938 → 1957 5' - GATTACCATGCGTGCAACAC-3'

acrB-R 2408 ← 2427 5' - CCAACGAGAAGAGGAGAACG-3'

Tamaño del fragmento amplificado: 409 pb

- **Secuencia del gen de la bomba de expulsión NorA en *S. aureus*:**

```

1  gcatgcaaat  gtgcaaaatg  accattgtct  agacgagaaa  tattacctaa  taagctcgtc
61  aattccagtg  gctcagtaat  atgttttct  tcgtattggt  tcgttgtaa  attgaaaaat
121 ttttaatacaa  cgtcatcaca  tgcaccaatg  ccgctgacag  atgtaaatgt  taagtcttgg
181 tcatctgcaa  aggttggtat  acattcaacg  atatcttctc  cttttccaa  cactagtagt
241 atagtatgat  tacttttttg  caatttcata  tgatcaatcc  cctttatfff  aatatgtcat
301 taattataca  attaaatgga  aaatagtgat  aattacaaaag  aaaaaatatt  gtcaaatgta
361 gcaatgtgt  aatacaatat  agaaactttt  tacgaatatt  tagcatgaat  tgcaatctgt
421 cgtggaaaag  aagaataaca  gctttaagca  tgacatggag  aaaaaagagg  tgagcatatg
481 aataaacaga  tttttgtctt  atattttaat  attttcttga  tttttttagg  tatcgggtta
541 gtaataccag  tcttgctgt  ttatttaaaa  gatttgggat  taactggtag  tgatttagga
601 ttactagtgt  ctgcttttgc  gttatctcaa  atgattatat  cgccgtttgg  tggtagccta
661 gctgacaaat  tagggaagaa  attaattata  tgtataggat  taattttggt  ttcagtgcta
721 gaatttatgt  ttgcagtgg  ccacaatttt  tcggtattga  tgttatcgag  agtgattggt
781 ggtatgagtg  ctggtatggt  aatgcctggt  gtgacagggt  taatagctga  catttcacca
841 agccatcaaa  aagcaaaaa  ctttggctac  atgtcagcga  ttatcaattc  tggattcatt
901 ttaggaccag  ggattggtg  atttatggca  gaagtttcac  atcgtatgcc  attttacttt
961 gcaggagcat  taggtattct  agcatttata  atgtcaattg  tattgattca  cgatccgaaa
1021 aagtctacga  caagtgggtt  ccaaaagtta  gagccacaat  tgctaacgaa  aattaactgg
1081 aaagtgttta  ttacaccagt  tattttaaca  cttgtattat  cgtttgggtt  atctgacttt
1141 gaaacattgt  attcactata  cacagctgac  aaggtaaatt  attcacctaa  agatatttgc
1201 attgctatta  cgggtggcgg  tataatttgg  gcacttttcc  aaatctattt  cttcgataaa
1261 tttatgaagt  atttctcaga  gttaacattt  atagcttgg  cattattata  ttcagttggt
1321 gtcttaatat  tattagtttt  tgctaatggc  tattggtcaa  taatgttaat  cagttttggt
1381 gtcttcatag  gttttgatag  gatacagaca  gccattacaa  attatttttc  taatattgct
1441 ggagaaaagg  aaggccttgc  aggcggattg  aactcgacat  tcaactagat  gggtaatttc
1501 ataggtcctt  taatcgcagg  tgcgttattt  gatgtacaca  ttgaagcacc  aatttatatg
1561 gctatagtg  tttcattagc  aggtgttgtt  attgttttaa  ttgaaaagca  acatagagca
1621 aaattgaaag  aacaaaatat  gtagcataag  tattttggtg  tataattgata  taagtaaag
1681 cgtaatat  tgaatgatta  gcatcgtttt  tcttatgaat  tttattaaga  aaattcgatg
1741 ctttacattt  aaaaagattc  gattgactaa  atgttttact  ctttatattt  aaatgttata
1801 tgtaacaaaa  aatgattttg  agtaataaac  atgttacaaa  tattacattc  ttttttaatt
1861 gcaatccaca  tacctaattc  attaacgtta  atgtgttaag  atgataaaaa  atgagtaagg
1921 aaatgtgggt  aaggggatga  cagtaaaaa  tttattttta  ggctttggtg  ctgtaattt
1981 aaccgtttgt  ttaattggtt  tattaatatt  agcaacaatg  aagatgcgct  tgctaaggta
2041 cataaaacaa  ttaatcgcct  taacgcgata  aatgtatcaa  ctgaagatac  ttataaaaaag
2101 aaaatggata  ttctcaatat  tcatactgct  aaagcatctg  aagtgatgaa  aatgtggaaa
2161 agcaaaatca  ttttaaacat  cgtgtgaatg  caataaatc  aaattccttt  aacgaacaag
2221 agtgccaagt  tattgctgat  cgttatgcag  ataagcatal  caatgataat  tatggtttag
2281 aaagaatttc  taagacaaat  catggtttag  aaagaatttc  taagacaaat  catggatata
2341 attatgttta  ttccaatgat  aattcaacta  gtaagcaaca  tgtaagtatt  tcaaatcaag
2401 gcataataac  gaaataatag  atggaacagt  gtattctaat  tggatatact  gtttttattt
2461 tgcaataaatt  taatttaaaa  aggtgaaatc  aactataaaa  atgatgtaa  tgttatgtca
2521 aatcaccaat  ccgtacatgt  attttaaaa  gttaatatag  ttctgaagaa  gtataaatga
2581 ggtgttgaaa  tggctaaaa  taagaaaacg  aacgcgatgc  gtatgcttga  tcgtgcaaaa
2641 attaaatag  aagttcatag  cttttag

```

norA-F 411 → 430 5'- TGCAATCTGTCTGGAAAAG - 3

norA-R 861 ← 880 5'- TCGCTGACATGTAGCCAAAG - 3

Tamaño del fragmento amplificado: 470 pb

- **Secuencia del regulon *marA* de *E. coli*.**

```

1 atgtccagac gcaactactga cgctattacc attcatagca tttggactg gatcgaggac
61 aacctggaat cgccactgtc actggagaaa gtgtcagagc gttcgggta ctccaaatgg
121 cacctgcaac ggatgtttaa aaaagaacc ggtcattcat taggcaata catccgcagc
181 cgtaagatga cggaaatcgc gcaaaagctg aaggaaagta acgagccgat actctatctg
241 gcagaacgat atggcttoga gtcgcaacaa actctgacc gaaccttcaa aaattacttt
301 gatgttccgc cgcataaata ccggatgacc aatatgcagg gogaatcgcg ctttttcat
361 ccattaaatc attacaacag cttag

```

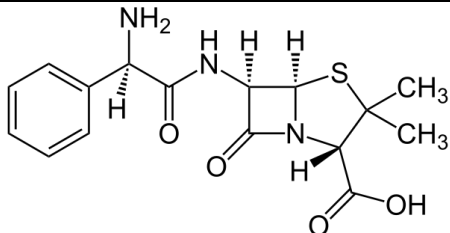
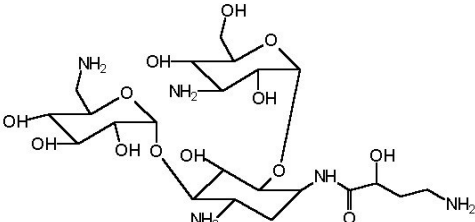
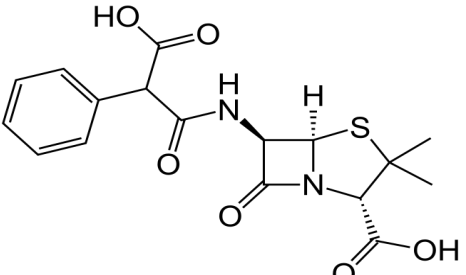
marA-F 35 → 55 5'- TAGCATTTTGGACTGGATCG -3

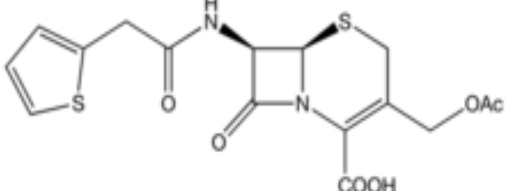
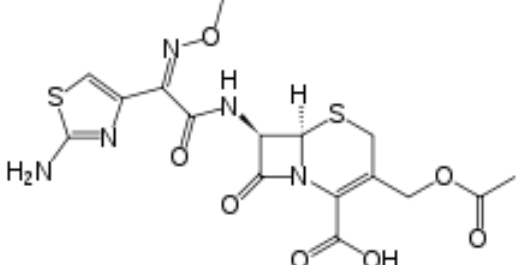
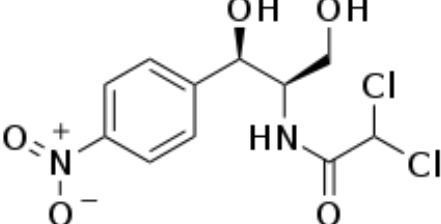
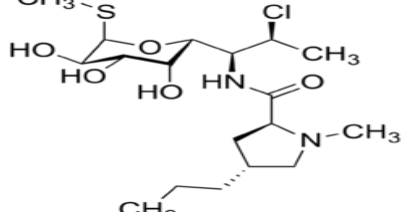
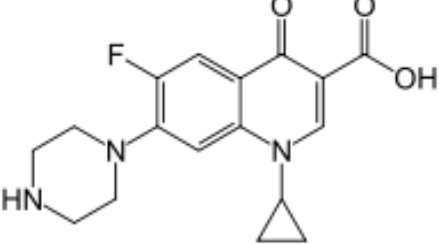
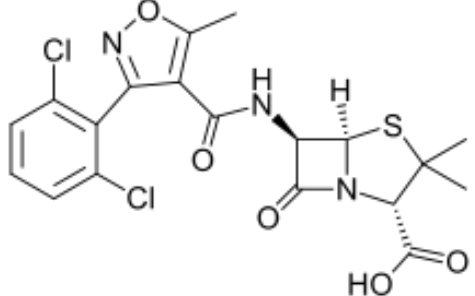
marA-R 318 ← 338 5'- TGCATATTGGTCATCCGGTA -3'

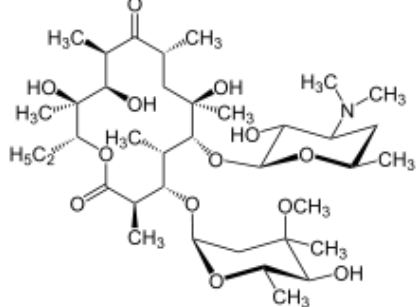
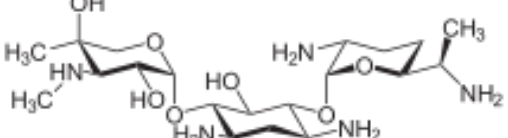
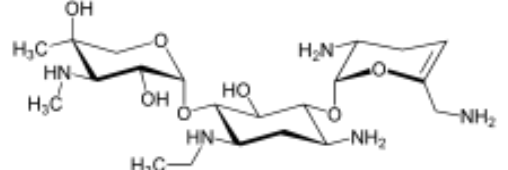
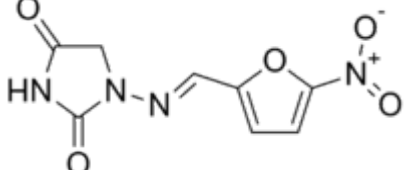
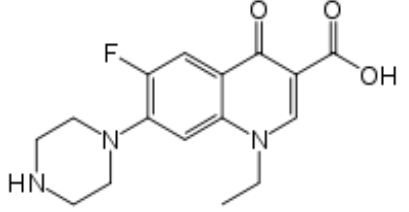
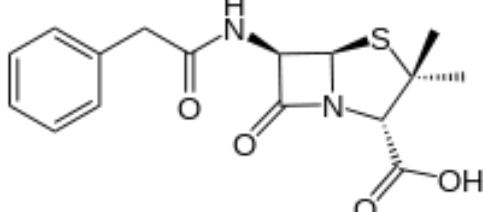
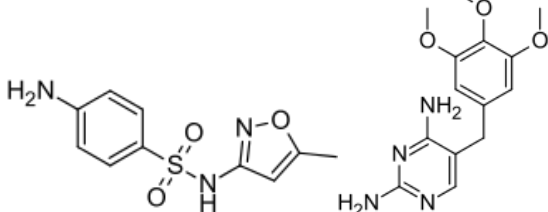
Tamaño del fragmento amplificado: 303 pb

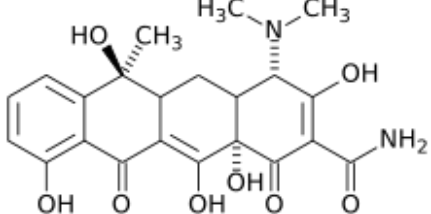
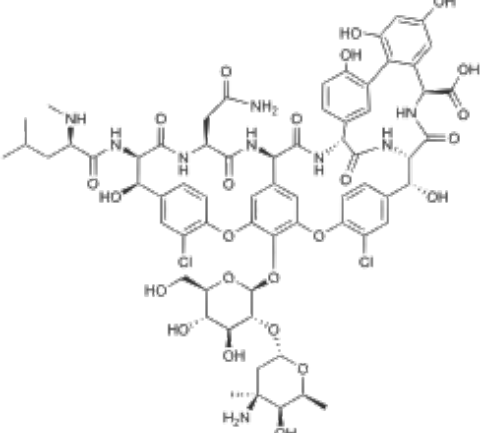
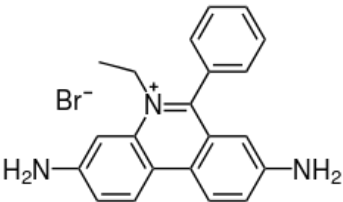
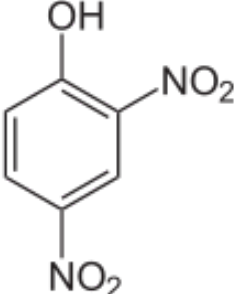
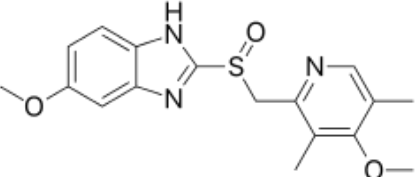
## ANEXO II.

Estructura química de los antibióticos y compuesto utilizados.

Compuesto	Estructura
Ampicilina	
Amikacina	
Carbencilina	

Cefalotina	 <p>The structure of Cefalotina is a cephalosporin. It features a central beta-lactam ring fused to a six-membered dihydrothiazine ring. The dihydrothiazine ring has a carboxylic acid group (-COOH) at the 3-position and an acetoxyethyl group (-CH2CH2OAc) at the 4-position. The beta-lactam ring is substituted at the 7-position with a (2-thienyl)acetamido group (-NHCOCH2C5H4S).</p>
Cefotaxima	 <p>The structure of Cefotaxima is a cephalosporin. It features a central beta-lactam ring fused to a six-membered dihydrothiazine ring. The dihydrothiazine ring has a carboxylic acid group (-COOH) at the 3-position and an acetoxyethyl group (-CH2CH2OAc) at the 4-position. The beta-lactam ring is substituted at the 7-position with a (2-amino-5-thiazolyl)acetamido group (-NHCOCH2C5H3NS(N)).</p>
Cloranfenicol	 <p>The structure of Cloranfenicol is a chloramphenicol derivative. It consists of a 2,2-dichloroethylamine group (-NHCH2CH2Cl2) attached to a 1-(4-nitrophenyl)ethane-1,2-diol moiety (-CH(OH)CH2C6H4NO2).</p>
Clindamicina	 <p>The structure of Clindamicina is a lincosamide. It features a 2-(1-methyl-2-propylpyrrolidin-5-yl)acetamido group (-NHCOCH2N(CH3)CH2CH2CH3) attached to a 2-chloro-1-(2,3,6-trihydroxy-4-methyl-5-(methylsulfanyl)oxy)ethyl group (-CH(Cl)CH2C3H5O3S(CH3)).</p>
Ciprofloxacino	 <p>The structure of Ciprofloxacino is a fluoroquinolone. It features a central pyridone ring system with a cyclopropyl group at the 8-position, a piperazine ring at the 7-position, a fluorine atom at the 6-position, and a carboxylic acid group (-COOH) at the 3-position.</p>
Dicloxacilina	 <p>The structure of Dicloxacilina is a dicloxacillin derivative. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. The thiazolidine ring has a carboxylic acid group (-COOH) at the 4-position and a tert-butyl group (-C(CH3)3) at the 5-position. The beta-lactam ring is substituted at the 6-position with a (2,4-dichlorophenyl)acetamido group (-NHCOCH2C6H3Cl2).</p>

Eritromicina	
Gentamicina	
Netilmicina	
Nitrofurantoina	
Norfloxacina	
Penicilina	
sulfametoxazol/ trimetoprim	

Tetraciclina	 <p>The structure shows a tetracycline molecule with a dimethylamino group (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) at the 4-position, a methyl group (CH<sub>3</sub>) at the 7-position, and a primary amide group (NH<sub>2</sub>) at the 12-position. It features a complex polycyclic core with multiple hydroxyl groups and carbonyl groups.</p>
Vancomicina	 <p>The structure is a large, complex glycopeptide consisting of a central aglycone core with multiple glycosylated side chains, including a decylamine chain and a trimethylammonium chain.</p>
Bromuro de etidio	 <p>The structure shows the cationic part of Etidium bromide, which is a 9-ethyl-10-phenyl-10H-phenanthroline derivative. The nitrogen atom is positively charged and associated with a bromide ion (Br<sup>-</sup>). It has amino groups at the 2 and 7 positions.</p>
2,4-Dinitrofenol	 <p>The structure is a benzene ring with a hydroxyl group (OH) at the 1-position and nitro groups (NO<sub>2</sub>) at the 2 and 4 positions.</p>
Omeprazol	 <p>The structure shows the omeprazole molecule, which consists of a benzimidazole ring system substituted with a methoxy group and a pyridine ring substituted with two methyl groups and a methoxy group, connected via a sulfinyl group.</p>

## REFERENCIAS.

1. Abelson, M. B. *et al.* The secrets of ocular microbiomes. *Review of Ophthalmology*, 2015, pp. 44 – 46.
2. Althani, A. A., *et al.* Human Microbiome and it's Association with health and Diseases. *Journal of Cellular Physiology*, 231, 2016, pp. 1688 – 1694.
3. Aminov, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology*, 1, 2010, pp. 1 - 7.
4. Andrews, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48, 2001, pp. 5 – 16.
5. Blair, J. M., *et al.* Molecular mechanism of antibiotic resistance. *Nature*, 13, 2014, pp. 42 – 51.
6. Borges-Walmsley, I. *et al.* Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochemical Journal*, 376, 2003, pp. 313 – 338.
7. Castiglioni, S. *et al.* Novel homologs of the multiple resistance regulator marA in antibiotic-contaminated environments. *Water research*, 42, 2008, pp. 4271 – 4280.
8. Calvo, J y Martínez, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27, 2009, pp. 44 – 52.
9. Cannon, B. Resistance fighters. *Nature*, 509, 2014, pp. S6 – S8.
10. Chen, P.R. *et al.* An oxidation-sensing mechanism is used by the global regulator MgrA in *Staphylococcus aureus*. *Nature Chemical Biology*, 2, 2006, pp. 591 – 595.
11. Cheng, H. R. & Jiang, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeast. *Biotechnology Letters*, 28, 2006, pp. 55 – 59.
12. Di Conza, J. and Gutkind, G. Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología*, 42, 2010, pp. 63 – 78.
13. Dong, Q. *et al.* Diversity of Bacteria at Healthy Human Conjunctiva. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 2011, pp. 5408 – 5413.
14. Eckburg, P. B. *et al.* Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, 308, 2005, 1635 – 1638.

15. Elliott, K. T. *et al.* Compy number change: envolving vie son gene amplification. *Future Microbiology*, 8, 2013, pp. 887 – 899.
16. French, G. The continuing crisis in antibiotic resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36S3, 2010, pp. S3 – S7.
17. Gonzales, G. *et al.* Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista Médica de Chile*, 132, 2004, 132, pp. 619 – 626.
18. Griffiths, A. J. F. *et al.* Genética. 9na ed. Aravaca, Madrid. Mc Graw Hill. 2008.
19. Grinius, L. L. y Goldberg, E. B. Bacterial Multidrug Resistance Is Due to a Single Membrane Protein Which Functions as a Drug Pump. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 1994, pp. 29998 – 30004.
20. Handzlik, J. *et al.* Recent Advances in Multi-Drug Resistance (MDR) Efflux Pump Inhibitors of Gram-Positive Bacteria *S. aureus*. *Antibiotics*, 2, 2013, pp. 28 – 45.
21. Huovinen, P. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Antimicrobial Resistance*, 32, 2001, pp. 1608 – 1614.
22. Holli, A. and Ahmed, Z. Preserving Antibiotics, Rationally. *The New England Journal of Medicine*. 369, 2013, pp. 2474 – 2476.
23. Jonkers, D. *et al.* Omeprazole inhibits growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria including *Helicobacter pylori* *in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 37, 1996, pp. 145 – 150.
24. Kaatz G. W., *et al.* Evidence for the Existence of a Multidrug Efflux Transporter Distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 19, 2000, pp. 1404 – 1406.
25. Khachatourians, G. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association*, 159, 1998, pp. 1129 – 1136.
26. Kohanski, M. A. How antibiotic kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 2010, 423 - 434.
27. Kumar, S. *et al.* Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. *International Journal of Bacteriology*, 2013, pp. 1 – 15.



28. Lederberg, J. & Lederberg, E. M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*, 63, 1952, pp. 399 – 406.
29. Li, X. & Nikaido, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Drugs*, 64, 2004, pp. 159 – 204.
30. Li, X. & Nikaido, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria (An Update). *Drugs*, 69, 2009, pp. 1555 – 1623.
31. Liberman, D. F. & Robertson, R. G. Evaluation of a rapid Bauer-Kirby antibiotic susceptibility determination. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7, 1975, pp. 250 – 255.
32. Luong, T. T. *et al.* *mgr*, a Novel Global Regulator in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 185, 2003, pp. 3703 – 3710.
33. Madigan, M. T. *et al.* Brock. Biología de los microorganismos. 12va ed. Madrid, España. Pearson- Addison Wesley. 2009.
34. Martínez, J. L. *et al.* What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature reviews microbiology*, 13, 2015, pp. 116 – 123.
35. McKeegan, K. S. *et al.* Structural understanding of efflux-mediated drug resistance: potential routes to efflux inhibition. *Current Opinion in Pharmacology*, 4, 2004, pp. 479 – 486.
36. McFarland, L. V. Normal flora: diversity and functions. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12, 2000, pp. 193 – 207.
37. Neyfakh, A. A. *et al.* Efflux – mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: Similarities and dissimilarities with the mammalian system. *PNAS*, 88, 1991, pp. 4781 – 4785.
38. Ni, W. *et al.* Effect of Proton Pump Inhibitors on *In Vitro* Activity of Tigecycline against Several Common Clinical Pathogens. *PLOS ONE*, 9, 2014, pp. 1 – 4.
39. Nikaido, H. Multidrug Efflux Pumps of Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 178, 1996, pp. 5853 – 5859.
40. Nikaido, H. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 2009, pp. 119 – 146.
41. Nikaido, H. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology*, 1, 1998, pp. 516 – 523.

42. Olivares, J. *et al.* The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 4, 2013, pp. 1 – 15.
43. Patiño C. D. ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos?. *Umbral científico*, 3, 2003, pp. 48 – 56.
44. Perry, J. A. *et al.* The antibiotic resistoma: what's new?. *Current Opinion in Microbiology*, 21, 2014, pp. 45 - 50
45. Piddock, L.J. V. Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nature reviews microbiology*, 4, 2006, pp. 629 – 636.
46. Reardon, S. Antibiotic resistance sweeping developing world. *Nature*, 509, 2014, pp. 141 – 142.
47. Saier, M. H. and Paulsen, I. Phylogeny of multidrug transporters. *Cell & Developmental Biology*, 12, 2001, pp. 205 – 213.
48. Sabate, M. y Prats, G. Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20, 2002, pp. 341 – 345
49. Sandegren, L. & Anderson, D. I. Bacterial gene amplification: implications for the evolution of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 7, 2009, pp. 578 – 588.
50. Schindler, B. D & Kaatz, G. W. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resistance Updates*, 27, 2016, pp. 1 – 13.
51. Sørum, H. Antibiotic resistance in food-related bacteria - a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 2002, pp. 43 – 56.
52. Suárez C. y Gudiol, F. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27, 2009, pp. 116 – 129.
53. Sun, J. *et al.* Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanism, physiology and pharmacological explotations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453, 2014, pp. 254 – 267.
54. Tenailon, O. *et al.* The population genetics of comensal *Esherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 8, 2010, pp. 207 – 217.
55. Van Bambeke, F. Antibiotic Efflux Pumps. *Biochemical Pharmacology*, 60, 2000, pp. 457 – 460.

56. Van Schaik, W. The human gut resistome. *Philosophical Transactions Royal Society B*, 370, 2015, pp. 1 – 9.
57. Vidailac, C. *et al.* Synthesis of Omeprazole Analogues and Evaluation of These as Potential Inhibitors of the Multidrug Efflux Pump NorA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 2007, pp. 831 – 838.
58. Walsh, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406, 2000, pp. 775 – 781.
59. Webber, M. A. and Piddock, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 2003, pp. 9 – 11.
60. Willcox, M. D. P. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Experimental eye research*, 117, 2013, pp. 99 – 105.
61. Wright, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 2007, pp. 175 - 186.
62. Yu, E. W. *et al.* AcrB Multidrug Efflux Pump of *Escherichia coli*: Composite Substrate-Binding of Exceptional Flexibility Generates Its Extremely Wide Substrate Specificity. *Journal of bacteriology*, 185, 2003, pp. 5657 – 5664.
63. Zgurskaya, H. I. Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 292, 2002, pp. 95 – 105.