



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MODELO MATEMÁTICO-COMPUTACIONAL
DE LA RESISTENCIA ADAPTATIVA EN BACTERIAS QUE
CRECEN EN GRADIENTES DE CONCENTRACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
GRISEL CÓRDOVA VILLALBA

TUTOR PRINCIPAL: MAXIMINO ALDANA GONZÁLEZ
[Instituto de Ciencias Físicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
RAFAEL PEÑA MILLER
[Centro de Ciencias Genómicas](#)
PABLO VINUESA FLEISCHMANN
[Centro de Ciencias Genómicas](#)

Ciudad de México. noviembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Resistencia a antibióticos: intrínseca, adquirida y adaptativa	4
Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia	7
Quinolonas	7
β -lactámicos	8
Macrólidos.....	9
Bombas de eflujo.....	11
Sistema AcrAB-ToIC de <i>Escherichia coli</i> y su regulación	13
AdR en el sistema AcrAB-ToIC.....	16
Herencia epigenética en el sistema AcrAB-ToIC	18
AdR como puente entre FTM y SSM en el sistema AcrAB-ToIC.....	19
Modelo de la red regulatoria de bombas de eflujo AcrAB-ToIC (EPRN)	21
EPRN en una célula.....	25
EPRN en una población	27
EPRN en un gradiente	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	32
Objetivo general.....	32
Objetivos particulares	33
METODOLOGÍA.....	33
RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES	52
APÉNDICE A	54
BIBLIOGRAFÍA.....	56

*Con amor
para la luz que llena de alegría
mi vida día con día.
mi familia.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Maximino Aldana González por dirigir esta tesis con esmero y dedicación, por explicarme con paciencia y ayudarme a entender el proyecto y las herramientas que necesitaba para desarrollarlo, así como por los recursos que me facilitó.

Al Dr. Santiago Sandoval Motta por su disposición para explicarme con calma y dedicación, y por ayudarme a desarrollar este trabajo.

A Rogelio Niño por explicarme las bases para programar.

A Saúl Huitzil Juárez por las observaciones que aportó al proyecto.

A la Lic. Lucía Brito Ocampo, a María Muñoz García y a Martha Cariño Aguilar por su orientación, ayuda y amabilidad para obtener la bibliografía necesaria.

A los miembros de mi comité tutorial: el Dr. Rafael Peña Miller y el Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann, por los señalamientos y recomendaciones oportunas a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A los miembros de mi jurado de examen de grado: Dr. Alejandro Alagón Cano, Dr. Lorenzo Segovia Forcella, Dra. Ayari Fuentes Hernández, Dr. Luis Antonio Mendoza Sierra y Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por las correcciones y observaciones pertinentes a este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca que me permitió realizar la Maestría en Ciencias Bioquímicas. Número de becario: 822778.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo recibido para asistir al “Taller de introducción a la Biología de sistemas: hacia una biología predictiva con modelos dinámicos no lineales”, que realizó en el Centro de Ciencias Matemáticas, UNAM Morelia (2018).

A la UNAM, por todas las oportunidades que me ha dado.

RESUMEN

La resistencia a antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública. Los principales aspectos de riesgo son su rápida adquisición, así como el uso de un mismo mecanismo de resistencia para varios antibióticos (multi-resistencia).

Los mecanismos de resistencia se clasifican en tres tipos principales (Fernández y Hancock, 2012): 1) intrínseca (mecanismos inherentes de los microorganismos para evadir la acción del antibiótico) 2) adquirida (modificaciones genéticas) y 3) adaptativa (AdR por sus siglas en inglés), que es la capacidad temporal para sobrevivir a una dosis de antibiótico, debido a alteraciones genéticas y/o a la expresión de las proteínas, como resultado de una exposición, este fenotipo se revierte después de que el antibiótico se elimina del medio y correlaciona con el fenómeno de multi-resistencia. Sin embargo, si la población se deja bajo la presión selectiva del antibiótico por un tiempo suficientemente largo, las células adquieren cambios genéticos y su fenotipo de resistencia se vuelve estable. Es decir, pasan de un mecanismo de resistencia transitorio y rápido a un mecanismo lento y estable, sugiriendo que la AdR funciona como un puente entre ambos (Sandoval-Motta y Aldana, 2016).

La AdR surge en escenarios donde se somete a la población microbiana a concentraciones de antibiótico no letales, por ejemplo, dosis sucesivas de antibiótico o gradientes espaciales de concentración de antibiótico (Sandoval-Motta y Aldana, 2016).

Se ha observado que la producción de bombas de eflujo está relacionada con la AdR, en específico el sistema AcrAB-TolC en *Escherichia coli*, del cual existe un modelo matemático propuesto por Sandoval *et al.*, 2015, en el que se da una evolución gradual pero inmediata de las bacterias bajo un escenario de dosis sucesivas de antibiótico, originando un fenotipo de resistencia adaptativa, el cual es reversible si la presión del antibiótico se elimina del medio, pero que se vuelve estable si el antibiótico se da de forma prolongada en la población.

En esta tesis también se obtuvo el fenotipo de AdR en gradientes de concentración de antibióticos lineales, mientras que, en los gradientes exponenciales, la adaptación de las poblaciones en las concentraciones de antibiótico más altas se da por mutaciones, sin embargo, en las concentraciones de antibiótico más bajas parece surgir el fenotipo de AdR. Lo que nos lleva a apoyar la propuesta de Sandoval-Motta y Aldana, 2016, sobre que la AdR funciona como un puente entre la resistencia intrínseca y la adquirida.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos es un problema de salud pública y representa una amenaza, sobre todo, para países en vías de desarrollo como México, pues a diferencia de los países desarrollados donde los patógenos se adquieren generalmente en hospitales, en los países pobres los patógenos multirresistentes (que tienen resistencia a más de un antibiótico) se encuentran no sólo en los hospitales sobrepoblados sino en las comunidades, las cuales tienen problemas de desnutrición y escasez de servicios médicos, además el mal manejo de basura y de aguas residuales, así como el hacinamiento de humanos y animales promueven el intercambio de microorganismos (comensales y patógenos) entre ambos, y aumentan la contaminación fecal del polvo urbano. Estas condiciones aumentan la probabilidad de que ocurra transferencia horizontal de genes de resistencia y de virulencia (Amábile-Cuevas, 2010). Por otro lado, la contaminación química puede seleccionar bacterias resistentes (Jiménez-Arribas *et al.*, 2001).

Entre las prácticas y situaciones que generan resistencia a antibióticos en México, tenemos (figura 1): 1) la automedicación, a la que se le atribuye del 28 al 43% de las compras de antibiótico en las farmacias en la década de los 90 (Amábile-Cuevas, 2010); 2) el uso de antibióticos genéricos, cuya actividad es menor que la de los antibióticos “originales” (Jones *et al.*, 2008), 3) el empleo de dosis bajas de antibióticos en la crianza industrial de animales de granja para promover su crecimiento y prevenir infecciones (Laxminarayan *et al.*, 2015), pues además del consumo de su carne, su estiércol es utilizado como abono y los desechos de estas industrias son vertidos a los cuerpos de agua. Cabe señalar que a nivel mundial, del 50 al 80% de los antibióticos que se produce al año, se destina a este tipo de industria (Amábile-Cuevas, 2015), convirtiéndola en la principal fuente de microorganismos con resistencia a antibióticos, 4) la utilización de estreptomycin en cultivos de peras y manzanas para combatir infecciones por *Erwinia amylovora*, y de oxitetraciclina en sembradíos de duraznos y nectarinas para controlar infecciones por *Xanthomonas arboricola* (Amábile-Cuevas, 2015), 5) uso de compuestos que co-seleccionan el fenotipo de resistencia de antibióticos como metales pesados (que se emplean en desinfectantes, pesticidas y fertilizantes, o que se liberan por actividades de agricultura y acuicultura) y herbicidas (como el glifosato) (Amábile-Cuevas, 2015), 6) el desagüe de la gran mayoría de los drenajes (que llevan entre otros residuos, los que se

producen en hospitales, industrias, hogares) en los cuerpos de agua (Amábile-Cuevas, 2015), 7) el depósito de basura proveniente de hospitales, hogares, industrias en los rellenos sanitarios, sin que cuenten con medidas ambientales adecuadas (Amábile-Cuevas, 2015) 8) la adquisición de enfermedades nosocomiales que varía desde 2.1 hasta 15.8% (DGED, 2011) y donde se aíslan patógenos como *Staphylococcus aureus* que es resistente a meticilina en el 48% de las muestras recuperadas (Amábile-Cuevas, 2010), *Escherichia coli* que es resistente a ampicilina en el 37.6% de las muestras, *Klebsiella pneumoniae* que presenta resistencia a ampicilina en el 46.9% de las muestras y *Pseudomonas aeruginosa* que es resistente a ceftriaxona en el 38.3% de las muestras, y que además son multirresistentes (DGE, 2016).

Los puntos mencionados en el párrafo anterior han provocado que en estudios donde se aíslan bacterias de humanos que habitan cierta comunidad, se encuentren patógenos resistentes a antibióticos. Por ejemplo, en datos recolectados de personas que viven en Ciudad de México, se hallaron patógenos como *Streptococcus pneumoniae* que presentan resistencia a penicilina y claritromicina en el 70 y 49% de las muestras aisladas respectivamente, *Salmonella* spp. que muestra resistencia a ampicilina y cotrimoxazol en el 66% de las muestras, *Shigella* spp. que muestra resistencia a ampicilina y cotrimoxazol en el 81% de las muestras, y *Escherichia coli* [uropatogénica] que es resistente a ampicilina y cotrimoxazol en el 74 y 60% de las muestras respectivamente, lo que indica que son cepas multirresistentes (Amábile-Cuevas, 2010).

Las bacterias pueden sobrevivir y prosperar en presencia de antibióticos, para ello cuentan con diversos mecanismos que les permiten lograrlo. Para entender mejor estos procesos, comenzaremos por describir la resistencia a antibióticos.

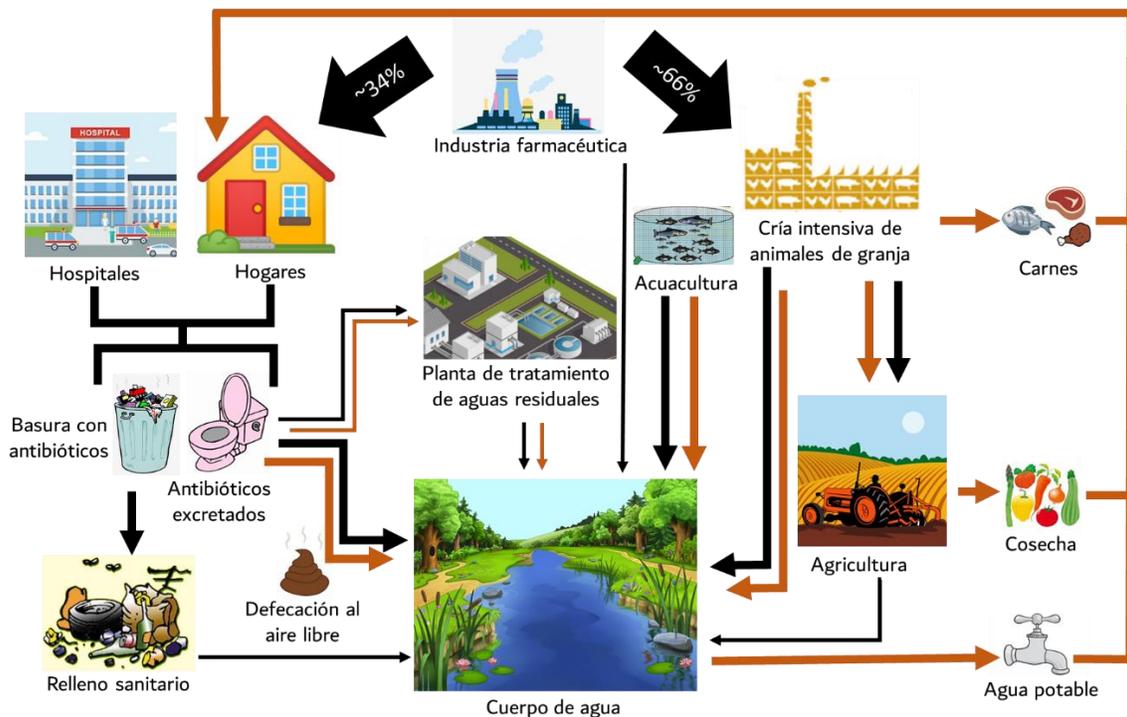


Figura 1. Actividades que liberan antibióticos y bacterias resistentes al ambiente. De los antibióticos que produce la industria farmacéutica, aproximadamente una tercera parte se destina a tratamientos de enfermedades y dos terceras partes a la cría intensiva de animales. Los hospitales y hogares desechan antibióticos directamente a la basura, o bien, después de que son metabolizados y excretados se liberan al drenaje junto con bacterias resistentes. La basura se lleva a rellenos sanitarios, donde por lixiviación y escurrimiento llegan a los suelos y aguas de asentamientos humanos, y el drenaje en su mayoría es descargado en cuerpos de agua, pero una pequeña parte se somete antes a un tratamiento en una planta de aguas residuales (lo que reduce la concentración de antibiótico pero también proporciona una presión de selección muy fuerte para seleccionar bacterias resistentes). La defecación al aire libre también expone antibiótico y bacterias resistentes en el medio. La cría intensiva de animales usa antibióticos y los desechos de esta industria se descargan en los cuerpos de agua, mientras que el estiércol de los animales se usa como fertilizante, lo que permite la acumulación de antibióticos y bacterias resistentes en el suelo y en los cuerpos de agua, además en algunos cultivos se utilizan antibióticos para combatir infecciones. La acuicultura se lleva a cabo en los cuerpos de agua o en estanques artificiales, lo cual implica que el antibiótico se libere de manera directa en los cuerpos de agua o que por lixiviación y escurrimiento llegue a éstos. Ahora bien, nosotros obtenemos alimentos de la cría intensiva de animales y de la agricultura, y adquirimos el agua potable de los cuerpos de agua, por lo que todos ellos vienen contaminados con bacterias resistentes. Las flechas negras representan el flujo de los antibióticos, las flechas naranjas el flujo de bacterias resistentes, el grosor de las líneas simboliza una aproximación de la cantidad del flujo. Modificado de Amábile-Cuevas, 2015.

Resistencia a antibióticos: intrínseca, adquirida y adaptativa

La resistencia a antibióticos se refiere al fracaso terapéutico de un antibiótico y puede clasificarse en intrínseca, adquirida y adaptativa. Sin embargo, los límites de esta clasificación no son estrictos y una característica puede ocupar más de una categoría (Amábile-Cuevas, 2015).

- Resistencia intrínseca: son las propiedades inherentes de una especie bacteriana que limitan la acción de un antibiótico (Amábile-Cuevas, 2015). Por ejemplo, las bacterias Gram negativas son intrínsecamente más resistentes que las bacterias Gram-positivas, a los antibióticos con estructuras hidrofílicas grandes, debido a que la membrana externa que poseen impide el paso de estas moléculas, tal es el caso de la vancomicina que no tiene efecto en las bacterias Gram-negativas (Arzanlou *et al.*, 2017).
- Resistencia adquirida: sucede cuando un microorganismo originalmente susceptible se vuelve resistente como resultado de mutaciones en su ácido desoxirribonucleico (DNA por sus siglas en inglés), o bien, por incorporación de material genético externo (Fernández y Hancock, 2012), es decir, por transferencia horizontal de genes (HGT por sus siglas en inglés), la cual puede ocurrir por tres mecanismos (Snyder *et al.*, 2013):
 - Transformación: las bacterias adquieren DNA presente en el medio (proveniente de la misma especie o de cualquier otra) bajo ciertas condiciones (como puede ser la presencia de moléculas de señalización de densidad de la población o el estado fisiológico de la célula) o incluso de manera constitutiva, y posteriormente lo integran a su genoma (Amábile-Cuevas, 2015).
 - Transducción: el DNA de la bacteria donadora es empaquetado en la cápside de un bacteriófago, así, cuando éste infecte a la bacteria receptora, el DNA de la bacteria donadora será introducido en ella.
 - Conjugación: es la transferencia de DNA de una bacteria donadora a una receptora mediante un plásmido autotransmisible (que codifica todos los elementos necesarios para moverse de una bacteria a otra), el cual puede tener incorporado DNA cromosómico de la bacteria donadora. En la conjugación, las dos cadenas de DNA del plásmido de la bacteria donadora se separan y una de ellas se traslada a la bacteria receptora a través de una estructura llamada pilus sexual.

Un caso de resistencia adquirida en *Pseudomonas aeruginosa* a los antibióticos de tipo aminoglucósidos (que inhiben la traducción al evitar la translocación del ribosoma [Snyder *et al.*, 2013]), ocurre cuando sus genes *nuoG* (codifica para NADH

deshidrogenasa que contribuye a la formación del gradiente electroquímico de protones en la membrana, así que al dañar su función la cantidad de antibiótico que puede introducirse a la célula es menor), *galU* (es necesario para la síntesis de los liposacáridos [LPS por sus siglas en inglés] que forman parte de la membrana externa, cuando la función del gen disminuye se forman moléculas de LPS truncadas, lo que resulta en un fenotipo con una permeabilidad de membrana baja), y *mexZ* (represor del gen *mexY* que codifica para el transportador multifármaco MexY, por lo que cuando su actividad se ve afectada permite la síntesis del transportador y por lo tanto el eflujo del antibiótico) presentan mutaciones que disminuyen o inhiben su actividad (Plesiat *et al.*, 2006); y también cuando adquieren por HGT, plásmidos que llevan codificadas enzimas que modifican (por acetilación, fosforilación o adenilación) a los aminoglucósidos para inactivarlos (Snyder *et al.*, 2013).

- Resistencia adaptativa (AdR por sus siglas en inglés): es un incremento temporal (es decir, se trata de mecanismos inducibles), en la capacidad de una bacteria para sobrevivir a un ataque de antibiótico como resultado de la exposición a un activador ambiental (estrés, condiciones de nutrientes, estado de crecimiento o dosis subinhibitorias de antibióticos), y se debe a cambios en la expresión de genes y/o proteínas. A diferencia de la resistencia intrínseca y adquirida, la AdR no es estable, es un fenotipo transitorio que se revierte después de que se elimina la condición que lo indujo (Fernández y Hancock, 2012).

La producción de las bombas de eflujo AcrAB-TolC, que disminuye la concentración de antibiótico en el interior de la célula, muestra este tipo de resistencia. Es un sistema de defensa no específico ya que muestra protección contra una gran variedad de tipos de antibióticos y xenobióticos, y es inducido por diferentes tipos de antibióticos y compuestos (como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [Nunoshiba *et al.*, 1993], fármacos como la aspirina [Rosner, 1985] o contaminantes ambientales como los herbicidas [Kurenbach *et al.*, 2015]). Más adelante, revisaremos con más detalle este sistema, pues es el tema principal de este trabajo.

Para comprender cómo surge la resistencia profundizaremos en los mecanismos moleculares que ocurren en este fenómeno. Describiremos cómo actúan algunos antibióticos y cómo la bacteria evade la acción de éstos.

Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia

Los antibióticos son sustancias de bajo peso molecular, se producen por microorganismos y plantas, o bien, de manera sintética, son selectivos y eliminan o inhiben el crecimiento de otros organismos, especialmente microorganismos (Smith *et al.*, 2000). Sin embargo, estos efectos se logran a concentraciones mucho más altas que las encontradas en la naturaleza, en donde los antibióticos actúan como moléculas de señalización y modulan la expresión de genes. Algunos aspectos fisiológicos que son afectados en esta forma, son los relacionados a la detección de quórum y a la formación de biopelículas (Sengupta *et al.*, 2013).

Los antibióticos se clasifican en varias clases de acuerdo a su mecanismo de acción, es decir, en cómo los antibióticos inducen la muerte de la bacteria, lo cual sucede por la interacción primaria del antibiótico con su objetivo celular. Entre estas clases encontramos los β -lactámicos que inhiben la síntesis de pared celular, las tetraciclinas y aminoglicósidos que bloquean la síntesis de proteína, las fluoroquinolonas que impiden la síntesis de DNA o las rifampicinas que frenan la síntesis de ácido ribonucleico (RNA por sus siglas en inglés) (Levy y Bonnie, 2004). A continuación, se exponen algunos ejemplos de interés para este trabajo.

Quinolonas

Las quinolonas, tienen como blanco celular la DNA-girasa (topoisomerasa II), que se encarga de eliminar el estrés torsional que se acumula delante de las horquillas de replicación y de los complejos de transcripción, y la topoisomerasa IV, cuya función es decatenar los cromosomas hijos después de la replicación (Aldred *et al.*, 2014). Estas actividades las logran al realizar una ruptura escalonada de ambas cadenas del DNA y pasar otras dos cadenas de DNA de otro sitio o bien de otro DNA, a través del corte que hicieron, y finalmente vuelven a ligar estos extremos (Snyder *et al.*, 2013). Las quinolonas se unen al complejo topoisomerasa-DNA (complejo de escisión), y bloquean físicamente el ligamiento de los extremos escalonados, de esta manera aumenta el número de rupturas de doble cadena en el cromosoma, lo que dispara la vía SOS para reparar el DNA, y también disminuye la concentración de topoisomerasas disponibles para aliviar el estrés

torsional y para decatenar cromosomas hijos, lo que provoca una pérdida de actividad enzimática y que procesos como la replicación, la transcripción y la división celular se vean afectados (Aldred *et al.*, 2014).

La resistencia a quinolonas se da por tres mecanismos (Aldred *et al.*, 2014): 1) mutaciones en el sitio de interacción de las topoisomerasas con el antibiótico, 2) adquisición de plásmidos que llevan genes de resistencia Qnr (que codifican para proteínas que imitan la estructura del DNA, lo cual promueve que las topoisomerasas se unan a estas moléculas en vez de unirse al DNA, además se une al complejo de escisión evitando que la quinolona pueda acceder a él), aac(6')-Ib-cr (esta proteína es una variante de una acetiltransferasa aminoglucósido que se encarga de acetilar el antibiótico disminuyendo así su actividad) y OqxAB, QepA1 y QepA2 (que son bombas de eflujo), 3) regulación de la expresión de porinas (disminuye la expresión) y bombas de eflujo (aumenta la expresión) codificadas en el cromosoma.

β-lactámicos

Los β-lactámicos inhiben la síntesis de pared celular al unirse de manera covalente a las proteínas de unión a penicilina (PBPs por sus siglas en inglés). Las PBPs son enzimas con dos dominios enzimáticos: el primero tiene actividad glicosiltransferasa y se encarga de polimerizar las subunidades que conforman el glicano (disacáridos formados por dos azúcares: N-acetilglucosamina [GlcNAc] y ácido N-acetilmurámico [MurNAc]) de la pared celular; el segundo posee actividad transpeptidasa y realiza enlaces entre dos péptidos que están unidos a un MurNAc. De tal manera que los glicanos alcanzan un tamaño de 10 a 100 subunidades (dependiendo de la especie bacteriana) y están unidos por cadenas peptídicas de 4 aminoácidos, conformando así el peptidoglicano. Los antibióticos β-lactámicos se parecen al sustrato que reconoce al dominio de la transpeptidasa y se unen covalentemente a este sitio de la enzima para inactivarla y disminuir la síntesis de peptidoglicano (Snyder *et al.*, 2013).

La resistencia a β-lactámicos ocurre por los siguientes mecanismos: 1) expresión de diferentes tipos de β-lactamasas, que son enzimas encargadas de hidrolizar al antibiótico, es decir, destruyen su actividad bactericida desactivando las propiedades químicas del antibiótico (Fernandes *et al.*, 2013), 2) uso de una PBP modificada en el dominio

transpeptidasa (que puede ser adquirida por HGT), el cual reconoce un sustrato diferente, evadiendo así la unión al β -lactámico (Snyder *et al.*, 2013), 3) disminución de la concentración de antibiótico dentro de la célula elevando la expresión de bombas de eflujo y reduciendo la expresión de porinas (Arzanlou *et al.*, 2017).

Macrólidos

Los macrólidos inhiben la traducción de proteínas. Este proceso se lleva a cabo en los ribosomas, que son estructuras compuestas por dos subunidades, las cuales se ensamblan una vez que el RNA mensajero (mRNA) se une a la subunidad pequeña, quedando en medio de ambas. Aquí se interpreta la información contenida en el mRNA mediante el apareamiento de los codones (tripletes de nucleótidos en el mRNA) con sus anticodones complementarios (contenidos en el RNA de transferencia [tRNA], el cual lleva su aminoácido correspondiente [aa-tRNA], previamente cargado por enzimas aminoacil tRNA sintetasa [aaRS]). Los tRNAs interactúan con el mRNA en tres sitios distintos del ribosoma: el sitio aminoacil (A), el sitio peptidil (P) y el sitio de salida (E). Luego de que se insertó el primer aminoácido del péptido (N-formilmetionina [fMet] en bacterias) en el sitio P o de que la cadena peptídica que se está sintetizando se encuentra sostenida en P, un aa-tRNA se introduce en el sitio A, si el codón y el anticodón son complementarios, se transfieren los aminoácidos que están unidos al tRNA ubicado en el sitio P, al tRNA que está en el sitio A, (lo cual agrega el aminoácido del tRNA que está en el sitio A, al extremo carboxilo terminal del péptido que se encontraba unido al tRNA del sitio P). Enseguida el tRNA del sitio P (que ya no está cargado) se mueve al sitio E y el tRNA del sitio A (que lleva la cadena polipeptídica) se traslada al sitio P, dejando disponible el sitio A para que entre otro aa-tRNA. El traslado al sitio E, del tRNA ubicado en el sitio P, expulsa al tRNA que pudiera estar ocupando el lugar anteriormente. Los macrólidos se unen a la subunidad grande del ribosoma cerca del sitio P, bloqueando el canal de salida del péptido que se está sintetizando, lo que provoca que el péptido se libere prematuramente (Snyder *et al.*, 2013).

Los mecanismos de resistencia que desarrollan las bacterias ante este tipo de antibióticos son: 1) metilación por enzimas Erm metilasas, de una base específica en la subunidad grande del ribosoma que causa un cambio conformacional y evita así, la unión adecuada del macrólido (Gaynor y Mankin, 2010). Estas enzimas son codificadas por

plásmidos y transposones (Snyder *et al.*, 2013), 2) mutaciones en la subunidad grande del ribosoma que modifican su estructura impidiendo la acción del antibiótico (Snyder *et al.*, 2013), 3) expresión de péptidos pequeños codificados en el ribosoma que parecen actuar de manera *cis* para evitar que el antibiótico funcione (Tenson y Mankin, 2001) y 4) expresión de bombas de eflujo (Snyder *et al.*, 2013).

A pesar de que esta clasificación nos da la idea de que el antibiótico sólo tiene un blanco celular, la muerte celular mediada por estas moléculas, es un proceso complejo que si bien, comienza con la interacción física entre la molécula y su blanco específico, también involucra alteraciones que afectan a la bacteria a nivel bioquímico, molecular, estructural (Kohanski *et al.*, 2010) y evolutivo. Tal es el caso de los tratamientos con girasa, β -lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, que producen especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), causando daño oxidativo a las células y contribuyendo a la letalidad del antibiótico (Dwyer *et al.*, 2015).

Por ello, enfocar el problema de resistencia a antibióticos, desde una perspectiva de biología de sistemas, podría ayudarnos a entender este fenómeno tomando en cuenta los diversos factores que lo conforman y las interacciones que existen entre éstos, y podríamos hacerlo en diversos aspectos como fisiológico, terapéutico o evolutivo por mencionar algunos. Este trabajo aborda el tema en el ámbito evolutivo, específicamente cómo una bacteria pasa de tener una resistencia intrínseca a una resistencia adquirida con la ayuda de un fenotipo de AdR, pues se ha observado que cuando las bacterias se someten a dosis subinhibitorias de antibiótico, rápidamente desarrollan mecanismos de defensa inestables (reversibles) y luego de una exposición prolongada al antibiótico sus mecanismos ya no son reversibles, de modo que la AdR parece ser el puente para pasar de una respuesta con mecanismos rápidos y transitorios (FTM por sus siglas en inglés) a una respuesta con mecanismos lentos y estables (SSM por sus siglas en inglés) (Sandoval-Motta y Aldana, 2016).

En cuanto a lo que se expuso sobre los mecanismos de resistencia, podemos notar que éstos pueden ser: a) específicos, es decir, que afectan la acción de un solo antibiótico, por ejemplo las mutaciones que ocurren en las topoisomerasas en el sitio de interacción con el antibiótico, y b) inespecíficos, los cuales perjudican la actividad de varios antibióticos al mismo tiempo, dando lugar a un fenotipo multirresistente, como sucede con las bombas

de eflujo que presentan resistencia a los tres tipos de antibiótico presentados antes (quinolonas, β -lactámicos y macrólidos).

Como ya se mencionó, las bombas de eflujo poseen un fenotipo de AdR, y además son un mecanismo inespecífico que conduce a un fenotipo multirresistente. Esto permite que cuando el antibiótico entra a la célula, induzca el sistema de bombas de eflujo, para que la concentración de esta molécula disminuya en el interior de la bacteria, evitando que el contacto con sus blancos sea letal y dando a la célula tiempo para desarrollar mecanismos de resistencia específicos al antibiótico que requieren de cambios en su DNA (resistencia adquirida), por lo que usaremos un sistema de bombas de eflujo como modelo para estudiar la AdR.

Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son transportadores involucrados en el traslado de nutrientes esenciales y de iones, en la excreción de sustancias deletéreas como algunos metabolitos endógenos de la bacteria, colorantes, detergentes, metales pesados y solventes orgánicos (Li y Nikaido, 2004; Blanco *et al.*, 2016), por lo que son el primer mecanismo de defensa contra los agentes tóxicos, evitando que se acumulen sustancias bactericidas o bacteriostáticas en el interior de la célula (Davies y Davies, 2010). Sin embargo, las bombas de eflujo están presentes en todos los microorganismos (patógenos y no patógenos), lo cual sugiere que su evolución y propagación se debe a que cumplen también otras funciones (Fernández y Hancock, 2012), por ejemplo, intervienen en la interacción hospedero-patógeno al permitir que este último expulse sales biliares, ácidos grasos y hormonas, lo que le permite adaptarse al estrés ejercido por el tracto intestinal del hospedero y así poder colonizarlo (Li y Nikaido, 2009; Sun *et al.*, 2014). Además, participan en la comunicación célula-célula a través de la expulsión de moléculas de señalización, entre las que se encuentra acil homoserín lactona (AHL por sus siglas en inglés) en bacterias Gram-negativas, que regula comportamientos de grupo como bioluminiscencia, conjugación, formación de biopelículas, motilidad, biosíntesis de antibiótico y producción de factores de virulencia (Amaral *et al.*, 2014).

Las bombas de eflujo se clasifican en 5 familias (figura 2) en función de su similitud de secuencias, su especificidad por los sustratos, número de componentes, número de regiones transmembranales y fuente de energía (Blanco *et al.*, 2016). Los nombres de las familias y algunas de sus características son (Li y Nikaido, 2004): 1) Superfamilia casete de unión a ATP (ABC por sus siglas en inglés): esta familia está impulsada por la hidrólisis de trifosfato de adenosina (ATP), se encarga del transporte de azúcares, amino ácidos, iones, fármacos, complejos de hierro y proteínas, y no es muy común en bacterias, 2) Superfamilia del máximo facilitador (MFS por sus siglas en inglés): su fuente de energía es la fuerza protón motriz (PMF por sus siglas en inglés) que realiza el traslado de azúcares, metabolitos, aniones y fármacos, 3) Familia de extrusión de compuestos tóxicos y multifármacos (MATE por sus siglas en inglés): usa PMF para obtener energía y expulsa colorantes catiónicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas, 4) Familia de resistencia a múltiples fármacos de bajo espectro (SMR por sus siglas en inglés): su fuente de energía es la PMF, sus sustratos son cationes lipofílicos como antisépticos y desinfectantes, y 5) familia de resistencia nodulación división celular (RND por sus siglas en inglés): utiliza PMF para llevar a cabo sus funciones, se encuentra sólo en bacterias Gram negativas, su estructura consiste en un complejo tripartita que abarca las dos membranas de estas bacterias (Blanco *et al.*, 2016). Es la familia más relevante a nivel médico, porque está involucrada en el fenómeno de multi-resistencia (debido a que tiene afinidad por una gran variedad de sustratos), muestra resistencia intrínseca, adquirida y adaptativa, y además permite la adquisición de mecanismos adicionales de resistencia como modificación de los blancos de los antibióticos o la producción de enzimas que degradan estas moléculas (Nikaido y Pagès, 2012). El sistema AcrAB-TolC de *Escherichia coli* pertenece a esta clasificación y está muy bien caracterizado, por otra parte, un gran número de enterobacterias aisladas durante una terapia con antibióticos tienen el fenotipo de multi-resistencia asociado a este tipo de bombas, razones por las cuales se tomó este sistema como modelo para este trabajo.

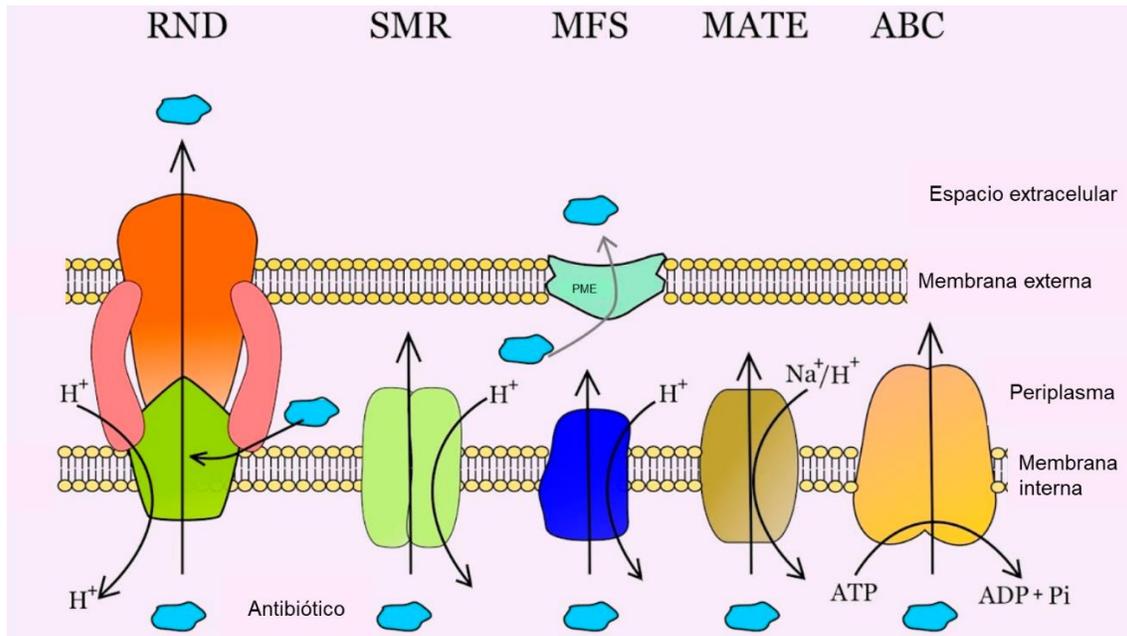


Figura 2. Familias de transportadores de eflujo. Sólo la familia RND forma un complejo tripartita, abarcando tanto la membrana interna como la externa, pues las otras cuatro familias únicamente se encuentran en la membrana interna de la célula. En la imagen se observa la fuente de energía que utiliza cada familia. PME: proteína de membrana externa. Tomado de Blanco *et al.*, 2016.

Sistema AcrAB-TolC de *Escherichia coli* y su regulación

Esta bomba de eflujo está conformada por tres proteínas distintas (figura 2 y figura 3B): 1) AcrB, que está anclado a la membrana citoplasmática y reconoce los sustratos, 2) AcrA, de la cual se necesitan dos unidades, flanquean a AcrB, y ayudan a la extrusión del sustrato a través del transportador AcrB, mediante acción peristáltica, y 3) TolC, que es un canal contiguo a AcrB, anclado a la membrana externa, y por donde finalmente es expulsado el sustrato (Amaral *et al.*, 2014).

Este sistema expulsa colorantes, detergentes (sales biliares), cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, β -lactámicos, fluoroquinolonas y solventes orgánicos (Blanco *et al.*, 2016), mismos que son inductores de su producción, lo que nos indica que diferentes presiones de selección (y no solamente los antibióticos) pueden originar un fenotipo de resistencia a antibióticos (Davies y Davies, 2010).

La regulación de este sistema de bombas se da a nivel local y global (Li y Nikaido, 2004; Li *et al.*, 2015) (figura 3). Los genes *acrA* y *acrB*, se encuentran en un operón que también contiene el gen *acrR*, el cual funciona como represor de dicho operón; el gen *tolC* no está en este operón, pero su expresión es controlada por los mismos reguladores. AcrR es el represor local del sistema de bombas AcrAB-TolC, inhibe la transcripción de *acrA* y *acrB*, aunque permite una transcripción basal de manera que las bombas se expresan de manera constitutiva, en otras palabras, estas bombas de eflujo otorgan resistencia intrínseca a la célula y un fenotipo multiresistente (Li y Nikaido, 2004; Li *et al.*, 2015). Además existen tres reguladores globales llamados MarA, SoxS y Rob, que promueven la expresión de *acrA*, *acrB*, *tolC* y *micF*, este último gen codifica un RNA pequeño que es complementario al 5'UTR del mRNA de *ompF* (gen que codifica para la porina OmpF), donde se encuentra la región de inicio de la traducción, por lo que el apareamiento entre MicF y el mRNA de *ompF* inhibe la traducción de la porina OmpF (Moat *et al.*, 2002).

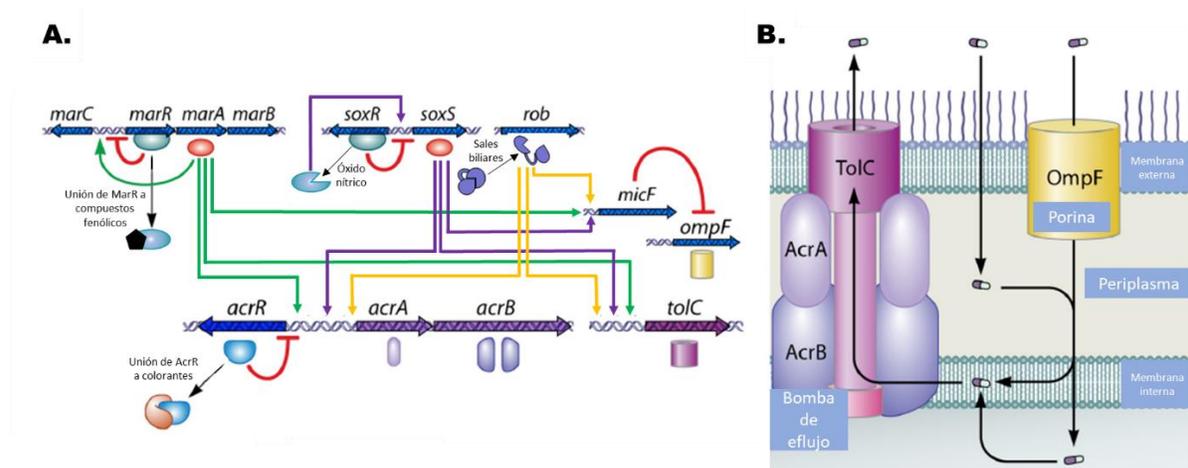


Figura 3. Regulación del sistema de bombas de eflujo AcrAB-TolC de *Escherichia coli*. A) La transcripción de los genes *acrAB* y *tolC* está regulado a nivel local y global. El represor local AcrR reprime la expresión de *acrAB* directamente, pero cuando se une a un inductor como un colorante, AcrR se despega del DNA y deja de inhibir la transcripción del operón. Los represores globales MarA, SoxS y Rob son activadores de la expresión de *acrAB*, *tolC* y *micF* (este último inhibe la traducción de la porina OmpF). Las líneas rojas muestran la represión de la transcripción por MarR y SoxR, y la represión de la traducción por MicF. Las líneas verdes representan la activación de la transcripción por MarA, las moradas por SoxS y las amarillas por Rob. MarA promueve la transcripción de las bombas de eflujo cuando el inductor (por ejemplo, compuestos fenólicos) se une a MarR y éste se desprende del DNA, permitiendo la unión de MarA y por lo tanto su propia transcripción. SoxS fomenta la producción de bombas de eflujo cuando en presencia de una señal de estrés oxidativo (como óxido nítrico) SoxR (que está reprimiendo el operón) se oxida y promueve ahora la transcripción de *soxS*. Rob se expresa en grandes cantidades de manera constitutiva en la célula, sólo que permanece inactivo hasta que el contacto con su inductor (sales biliares o ácidos grasos) libera una región que tiene secuestrada, lo que le permite adoptar su forma activa. B) Estructura de la bomba de eflujo AcrAB-TolC codificada por los genes *acrAB* y *tolC*, cuya transcripción es activada por los reguladores globales MarA, SoxS y Rob, los cuales inhiben al mismo tiempo la traducción de las porinas OmpF. Las porinas permiten la entrada de antibiótico y las bombas de eflujo se encargan de su extrusión, por lo que al disminuir la expresión de OmpF y aumentar la de AcrAB-TolC, la concentración del antibiótico disminuye en el interior de la célula. Modificado de Duval y Lister, 2014; Li et al., 2015.

El regulador MarA se encuentra en el locus de multi-resistencia a antibióticos (*mar* por sus siglas en inglés), que está compuesto por dos unidades transcripcionales divergentes: *marRAB* y *marC*, las cuales son transcritas a partir de una región común conocida como *marO* (que es el sitio de unión del activador y represor). MarR es el represor del operón, MarA es el activador, MarB inhibe a *marA* al parecer de forma postranscripcional y la función de MarC se desconoce; en ausencia de un inductor (como quinolonas, β -lactámicos o macrólidos), MarR permanece unido a *marO* bloqueando la transcripción del operón (no obstante, hay una nivel basal de transcripción del locus *mar*), pero cuando el inductor entra a la célula se une al represor, liberando el sitio *marO*, donde ahora puede unirse el activador (MarA) e impulsar la transcripción de *acrAB*, *tolC*, *micF* y de su propio operón (Li y Nikaido, 2004; Duval y Lister, 2014; Li et al., 2015).

SoxS pertenece a un operón de respuesta a estrés oxidativo, que tiene dos genes que se transcriben divergentemente: *soxR*, el represor del operón y *soxS*, que fomenta la transcripción de *acrAB*, *tolC* y *micF*. En ausencia de estrés oxidativo, SoxR se une al promotor de *soxS* y evita su transcripción, cuando hay estrés por moléculas como óxido nítrico, el represor se oxida y se convierte en activador (Duval y Lister, 2014; Li et al., 2015).

Rob, a diferencia de MarA y SoxS que se sintetizan *de novo* en presencia de una señal activadora, se expresa de manera constitutiva y abundante, pero permanece en estado inactivo (Duval y Lister, 2014) a través de un mecanismo de secuestro de una región de esta proteína que es liberada y expuesta después de que tiene contacto con sus

inductores (sales biliares o ácidos grasos), y así Rob puede activar la transcripción de *acrAB*, *tolC* y *micF* (Griffith *et al.*, 2009).

De manera que esta respuesta incrementa el eflujo de antibióticos y disminuye la permeabilidad de la membrana, lo que da lugar a un fenotipo de resistencia a antibióticos, además aumenta la resistencia a superóxidos y la tolerancia a solventes orgánicos (Martin *et al.*, 2009).

AdR en el sistema AcrAB-TolC

Se necesitan ciertas características en el sistema para que la AdR pueda surgir, las cuales se han determinado a partir de experimentos (Adam *et al.*, 2008) donde una población isogénica de bacterias es sometida a concentraciones subinhibitorias de antibiótico y sobrevive el 20% de las células, posteriormente se someten a dosis más altas y se puede ver que las bacterias que estuvieron en contacto previamente con una concentración más baja de antibiótico, tienen una sobrevivencia mayor que aquellas que son expuestas por primera vez. Pero una vez que se elimina el antibiótico del medio la capacidad de resistencia a antibiótico se revierte en un 95% de la población. Ambos porcentajes son muy altos para ser explicados por mutaciones (pues las mutaciones en una cepa silvestre de *E. coli* ocurren con una frecuencia de 1×10^{-7} por gen por generación [Chen y Zhang, 2013], mientras que para un evento de reversión se necesita una mutación en el mismo lugar que originó el fenotipo resistente, lo cual es menos frecuente aún y puede ocurrir con una probabilidad de 2×10^{-10} [Levin *et al.*, 2000]), por lo que se supone que los cambios son originados por modificaciones epigenéticas, los cuales tienen la característica de que son heredables, menos estables y suceden en una escala de tiempo más corta.

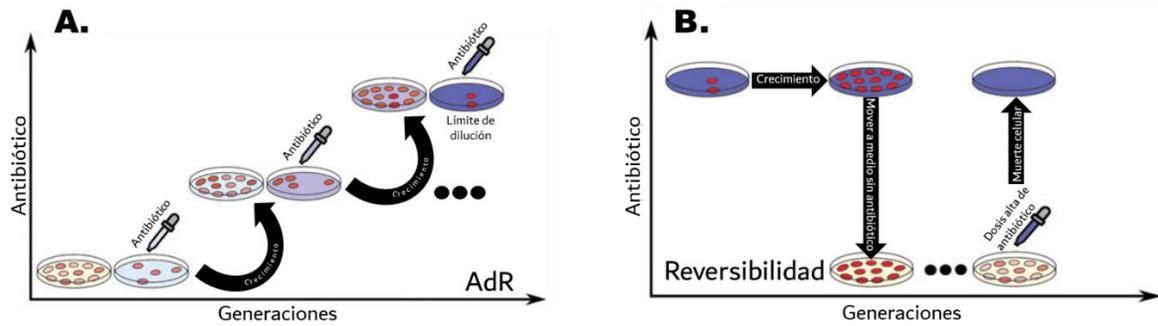


Figura 4. Experimentos para observar un fenotipo de AdR. A) El fenotipo de AdR se obtiene después de que a una población isogénica se le administran dosis de antibiótico que van incrementando su concentración. A pesar de que la población no tiene una variabilidad genotípica significativa, existe variabilidad fenotípica debido a una expresión aleatoria de genes, sobre la cual puede actuar la selección. Las células que sobreviven a una dosis subinhibitoria de antibiótico (20% aproximadamente), se duplican hasta que alcanzan un tamaño de población similar al anterior, entonces se somete a la población a una concentración de antibiótico mayor, nuevamente sobrevive una fracción de la población y el proceso se repite hasta que la población puede sobrevivir cerca de los límites de dilución del antibiótico. B) Las células que obtienen el nivel más alto de resistencia se trasladan a medio sin antibiótico y después de un tiempo corto, las bacterias se exponen a la misma concentración de antibiótico a la que alcanzaron su nivel máximo de resistencia. Las bacterias no son capaces de soportar esta concentración y mueren, es decir, el fenotipo de resistencia es inestable. Tomado de Sandoval y Aldana, 2016.

De los experimentos anteriores podemos decir que se requieren las siguientes propiedades para un conseguir un fenotipo de AdR (Adam *et al.*, 2008; Sandoval y Aldana, 2016):

1. Variabilidad fenotípica, que pueden no depender de aspectos genéticos ni epigenéticos (ya que la población inicial del experimento es isogénica y todas las bacterias de esta población están expuestas a las mismas condiciones ambientales), sino de procesos estocásticos inherentes a los procesos celulares bioquímicos, como la transcripción que puede dar lugar a diferencias en la expresión de genes, y la distribución aleatoria de componentes citoplásmicos (Davidson y Surette, 2008), o bien, puede originarse por diferencias en los niveles de expresión de las bombas de eflujo debido a que los patrones de metilación de los genes que permiten su producción son distintos, en otras palabras por cambios epigenéticos (ver sección "Herencia epigenética en el sistema AcrAB-TolC").
2. Herencia, en otras palabras, memoria a través de las generaciones que "guarda" los mecanismos que producen la resistencia a antibióticos, de tal forma que la población incrementa su nivel de resistencia gradualmente.

3. Cambios epigenéticos, pues tanto las altas tasas de sobrevivencia como de reversibilidad, no pueden ser explicadas por mutaciones genéticas.
4. Presión de selección, en este caso el antibiótico, que en un inicio debe estar presente a concentraciones bajas y se va aumentando de gradualmente.

Como ya se había indicado, las bombas de eflujo AcrAB-TolC tienen un fenotipo de AdR porque se expresan cuando son inducidas por una señal (por ejemplo, el antibiótico) y cuando el inductor se elimina el fenotipo se revierte, además, la resistencia otorgada por las bombas va aumentando de manera gradual. Estas características sugieren que la herencia epigenética esté involucrada en este sistema.

Herencia epigenética en el sistema AcrAB-TolC

La mayoría de los sistemas epigenéticos conocidos en bacterias usan la metilación del DNA como mecanismo de herencia (Sanchez-Romero y Casadesus, 2014). La herencia epigenética observada en el sistema AcrAB-TolC de *E. coli*, podría ser originada en esta forma a través de la enzima desoxiadenosina metiltransferasa (DAM por sus siglas en inglés). DAM metila la adenina de la secuencia GATC, la cual se encuentra aproximadamente 18,000 veces en el genoma de esta bacteria, y distingue así, la cadena de DNA recién sintetizada de la cadena templado, pues la cadena nueva de DNA permanece temporalmente sin metilar (Adam *et al.*, 2008), es decir, la cadena de DNA se encuentra en un estado hemimetilado por un periodo de tiempo corto (dicho estado tiene también implicaciones en el inicio de la replicación y en la reparación del DNA [Snyder *et al.*, 2013; Sanchez-Romero y Casadesus, 2014]). La mayoría de las secuencias GATC están metiladas, pero algunos de estos sitios son variables y el hecho de que estén o no metilados, tiene un impacto en la expresión de genes, por ejemplo, el gen *flu*, que participa en la formación de biopelículas (Henderson y Owen, 1999). En el caso del sistema AcrAB-TolC, se ha visto que cuando se pierde la función de DAM, la expresión del operón Mar se ve disminuida (Adam *et al.*, 2008), lo que nos sugiere que su expresión se ve afectada por un mecanismo de metilación.

Las modificaciones debido a cambios epigenéticos son al menos un orden de magnitud más frecuentes que las que se deben a cambios genéticos (Rando y Verstrepen, 2007), lo cual permite que los organismos puedan responder de manera más rápida a las señales del ambiente (Sanchez-Romero y Casadesus, 2014), aunque los cambios sean menos estables (reversibles). Sin embargo, hay una relación entre modificaciones epigenéticas y genéticas, ya que en el sistema AcrAB-TolC, después de haber inducido el fenotipo de AdR (por herencia epigenética), si la población se deja en contacto con el antibiótico por un tiempo largo, se observan mutaciones genéticas, que otorgan a la población mecanismos de resistencia permanentes (Sandoval-Motta y Aldana, 2016).

AdR como puente entre FTM y SSM en el sistema AcrAB-TolC

De acuerdo al tiempo que tardan en aparecer, podemos clasificar a los mecanismos que confieren resistencia en (Sandoval-Motta y Aldana, 2016):

- Mecanismos rápidos y transitorios (FTM): ocurren en escalas de tiempo cortas, implica cambios fenotípicos graduales, suceden en respuesta a la selección del antibiótico, tienen la desventaja de que las células crecen más lento, la aparición de estos mecanismos depende de procesos como el ruido y la metilación del DNA (herencia epigenética).
- Mecanismos lentos y estables (SSM): aparecen después de estar en contacto con el antibiótico durante largos periodos, son cambios secuenciales discontinuos que compensan las desventajas de los mecanismos rápidos y transitorios, son menos reversibles, generalmente conceden resistencia permanente contra un antibiótico específico, en su manifestación están involucradas las mutaciones genéticas (herencia genética).

Así, se propone que la AdR es un puente entre ambos FTM y SSM (Sandoval-Motta y Aldana, 2016) (figura 5). En el sistema AcrAB-TolC, se ha sugerido que pueden originarse tanto los FTM como los SSM. Respecto a los FTM, se sabe que AcrAB-TolC se expresa de manera constitutiva en las bacterias, pues es parte de la resistencia intrínseca de las células, sin embargo, en una población de bacterias los niveles de expresión de las bombas

de flujo varían, ya sea por ruido o por diferencias en los patrones de metilación. Cuando se expone a la población a dosis bajas de antibiótico, se selecciona a aquellas bacterias que tienen una expresión mayor del sistema AcrAB-TolC, y esta característica de expresión elevada de bombas, se hereda a la siguiente generación gracias a los patrones de metilación que “guardan” esta información (herencia epigenética). Las células seleccionadas vuelven a ser expuestas a una dosis de antibiótico mayor y sólo las bacterias con los niveles más altos de expresión de AcrAB-TolC son capaces de soportar el estrés, y el ciclo se repite (Adam *et al.*, 2008). Es por la herencia epigenética que la evolución de la población sucede de forma rápida y gradual, sin embargo, si el antibiótico se elimina del medio el fenotipo de resistencia se revierte inmediatamente, pues la síntesis de bombas tiene un costo para la célula que la hace crecer más lento (Sandoval-Motta y Aldana, 2016). En cuanto a los SSM, si dejamos a la población en contacto con el antibiótico por un tiempo más largo comienzan a aparecer mutaciones que impiden que el fenotipo de resistencia desaparezca cuando se retire el antibiótico del medio.

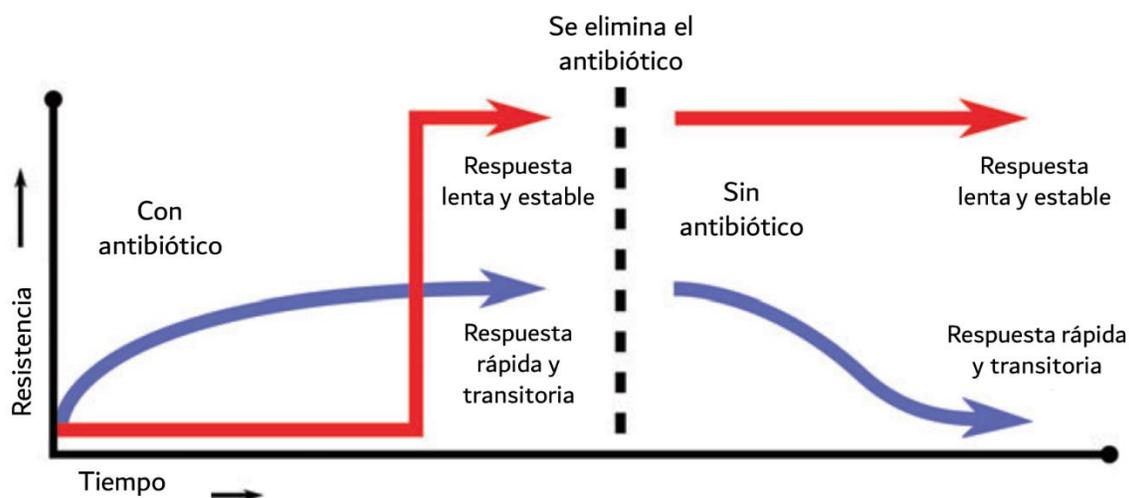


Figura 5. FTM y SSM. La flecha azul representa los FTM, que aparecen cuando la población de bacterias se somete a concentraciones subinhibitorias de antibiótico, experimentos de los que se obtiene una sobrevivencia del 20%, este porcentaje es explicado por procesos como el ruido o la herencia de patrones de metilación que afectan la expresión de los genes y permiten que la resistencia aumente continua y rápidamente, pero también que haya reversibilidad del fenotipo, es decir, que surja un fenotipo de AdR. Estos FTM hacen posible que la población responda y se adapte a las señales temporales del ambiente y desaparecen una vez que se elimina la señal que los indujo. Pero si la señal dura por periodos de tiempo largos, aparecen mutaciones genéticas y por lo tanto los SSM, representados por la flecha roja, lo que promueve que la resistencia se incremente de manera discontinua y lenta, pero estable, pues cuando se retira el antibiótico el fenotipo resistente se mantiene en la población. Tomado de Sandoval y Aldana, 2016.

Tomando en cuenta la regulación del sistema de bombas AcrAB y los rasgos necesarios para la aparición de un fenotipo de AdR, Motta *et al.*, propuso un modelo teórico para establecer cuantitativamente los elementos que son esenciales para obtener una resistencia reversible.

Modelo de la red regulatoria de bombas de eflujo AcrAB-TolC (EPRN)

El modelo construido por Motta *et al.* está basado en la red de regulación del sistema de bombas de eflujo (EPRN por sus siglas en inglés) AcrAB-TolC de *E. coli* (figura 6A) descrito en la sección "Sistema AcrAB-TolC de *Escherichia coli* y su regulación". Sin embargo, la red se simplificó con la ayuda de simulaciones numéricas y se identificaron los elementos dinámicos más importantes (figura 6B). Con esta red simplificada, fue con la que se trabajó, ya que esencialmente arroja los mismos resultados que la red completa. En esta versión de la red se usan nombres genéricos como activador y represor en lugar de *marA* y *marR*. En este trabajo el antibiótico es el inductor, a pesar de que existen más activadores en esta red (Motta *et al.*, 2015).

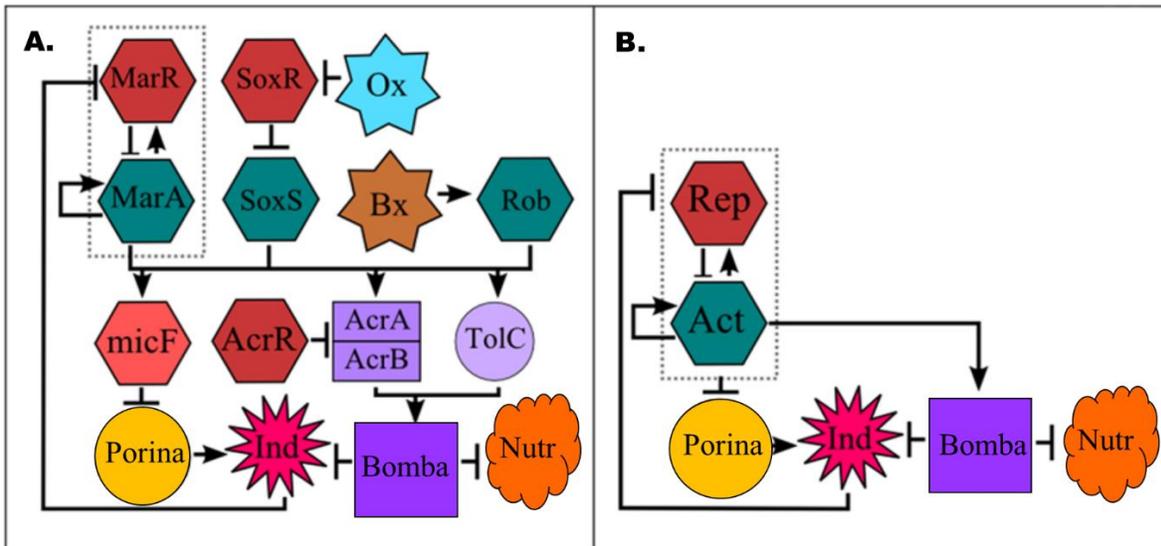


Figura 6. Modelo de la red regulatoria de bombas de eflujo. A) Red regulatoria de las bombas de eflujo AcrAB-TolC de *E. coli*, basada en Li y Nikaido, 2009. B) Versión simplificada de la red regulatoria AcrAB-TolC, donde se muestra que el activador y el represor son dos factores transcripcionales que están en el mismo operón enmarcándolos en un cuadro de líneas punteadas. Si el represor está unido al DNA, la transcripción del operón está inhibida, pero cuando el antibiótico entra a la célula se une al represor ocasionando que éste se desprenda del DNA y libere el sitio de unión del activador, que una vez unido al DNA promueve la transcripción del operón, lo que tiene como resultado un aumento en la cantidad de bombas de eflujo y la disminución de la síntesis de porinas. Las bombas de eflujo expulsan tanto el inductor como algunos nutrientes, lo que tiene un costo para la célula, pues la célula tarda más en crecer y el tiempo de división se incrementa. Las flechas con extremos puntiagudos indican regulación positiva, mientras que las flechas con extremos romos señalan represión. Act: activador. Rep: represor. Ind: inductor. Nutr: nutrientes. Ox: óxido nítrico. Bx: sales biliares. Tomado de Motta *et al.*, 2015.

La dinámica de la red consiste en que los factores de transcripción, activador y represor (que se encuentran en el mismo operón), autorregulan su propia transcripción. En ausencia de antibiótico, el represor tiene una alta afinidad por la región promotora del operón al menos cuatro veces más alta que la del activador, por lo que su transcripción permanece mayormente inhibida. Cuando el antibiótico entra a la célula a través de las porinas, se une a la molécula del represor, logrando que la región promotora quede libre para que el activador pueda unirse. El activador promueve su propia expresión, así como la de las bombas de eflujo, al mismo tiempo que evita la síntesis de porinas (Motta *et al.*, 2015). Estas acciones disminuyen la concentración de antibiótico en el interior de la célula.

Motta *et al.* planteó seis ecuaciones diferenciales y una algebraica, que simulan el comportamiento de la EPRN en una célula.

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

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

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

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

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

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

$$R^* = \frac{R}{1 + \frac{I}{K_I}}$$

En la tabla 1 se indican los significados de las variables y de los parámetros que utilizan las ecuaciones. En la tabla 2 se indican los valores de los parámetros que fueron utilizados para las obtener los resultados de las simulaciones de la presente tesis.

Los círculos verdes señalan los parámetros principales de los que depende el flujo de los antibióticos: la tasa de transcripción del operón de la EPRN β_0 , que afecta la cantidad de bombas que tiene la célula, y ε_I , que controla cuánto antibiótico puede ser expulsado de la célula en cierto lapso de tiempo (Motta *et al.*, 2015).

Tabla 1. Significado de los parámetros y variables que utilizan las ecuaciones que simulan el comportamiento de la EPRN.
Modificado de Motta *et al.*, 2015.

Parámetro o variable	Significado
A	Concentración del activador
R	Concentración total del represor
R*	Concentración del represor en su forma activa (cuando está unido al DNA)
Q	Concentración de porinas
P	Concentración de bombas
I	Concentración interna del inductor/antibiótico
I _{ext}	Concentración externa del inductor/antibiótico
F	Concentración interna de nutrientes
F _{ext}	Concentración externa de nutrientes
K _I	Constante de afinidad entre el inductor y el represor
K _A	Constante de afinidad entre el activador y el DNA
K _R	Constantes de afinidad entre el represor y el DNA
β ₀	Tasa máxima de transcripción del operón Act-Rep
β _x	Tasa máxima de transcripción de x
γ _x	Constante de degradación del elemento x de la red
ρ	Tasa de entrada de los nutrientes a la célula
ε _F	Tasa de expulsión de los nutrientes de la célula
II	Tasa de entrada del inductor a la célula
ε _I	Tasa de expulsión del inductor de la célula (Eficiencia de las bombas)
μ _β	Promedio de la distribución Gaussiana que determina la tasa de transcripción β ₀ del operón activador/represor
σ _β	Varianza de la distribución Gaussiana que determina la tasa de transcripción β ₀ del operón activador/represor
ξ _x	Ruido Gaussiano asociado al elemento x de la red
μ _{noise}	Promedio de la distribución Gaussiana que determina el ruido ξ _x para el elemento x de la red
σ _{noise}	Varianza de la distribución Gaussiana que determina el ruido ξ _x para el elemento x de la red
θ _F	Concentración interna de nutrientes que debe alcanzar la célula para poder dividirse
θ _I	Concentración interna de inductor que mata a la célula

Estas ecuaciones fueron implementadas en un algoritmo cuyo objetivo era simular el comportamiento de una célula en presencia de antibiótico y se obtuvieron los resultados que se presentan en las dos siguientes secciones (Motta *et al.*, 2015).

Tabla 2. Valores de los parámetros que fueron utilizados para obtener los resultados de esta tesis. Modificado de Motta *et al.*, 2015.

Parámetro	Valor
γ _A	0.5
γ _R	0.2
γ _P	0.2
γ _Q	1

μ	1
ϵ_F	0.365
K_{R^*}	0.25
K_I	0.05
θ_F	6
σ_ϵ	0.005
β_P	0.2
θ_I	0.5
μ_{noise}	0
μ_β	0.5
μ_ϵ	0.5
$\Theta_{diff}, \Theta_{int}$	3.1
ρ	0.35
K_A	1
σ_{noise}	0.1
σ_β	0.1
F_{ext}	10
β_Q	0.1

EPRN en una célula

Al simular el comportamiento de la EPRN en una bacteria con las ecuaciones expuestas anteriormente, observamos que cuando la tasa de transcripción del operón Act-Rep (β_0) es igual a 0, la bacteria no es capaz de responder al estímulo del antibiótico, y no puede aumentar la expresión del operón aun en presencia de antibiótico. Al aumentar β_0 a un valor de 5, la bacteria aumenta significativamente la síntesis de activador cuando el antibiótico entra a la célula, lo que conlleva a un aumento en el número de bombas (figura 7) (Motta *et al.*, 2015).

No obstante, esta respuesta que permite sobrevivir a la célula en un ambiente con antibiótico, tiene un costo para la bacteria, pues la producción de bombas de eflujo además de que permite la expulsión de los antibióticos, también posibilita la eliminación de nutrientes, lo que tiene como consecuencia que la bacteria crezca más lento (figura 8) (Motta *et al.*, 2015).

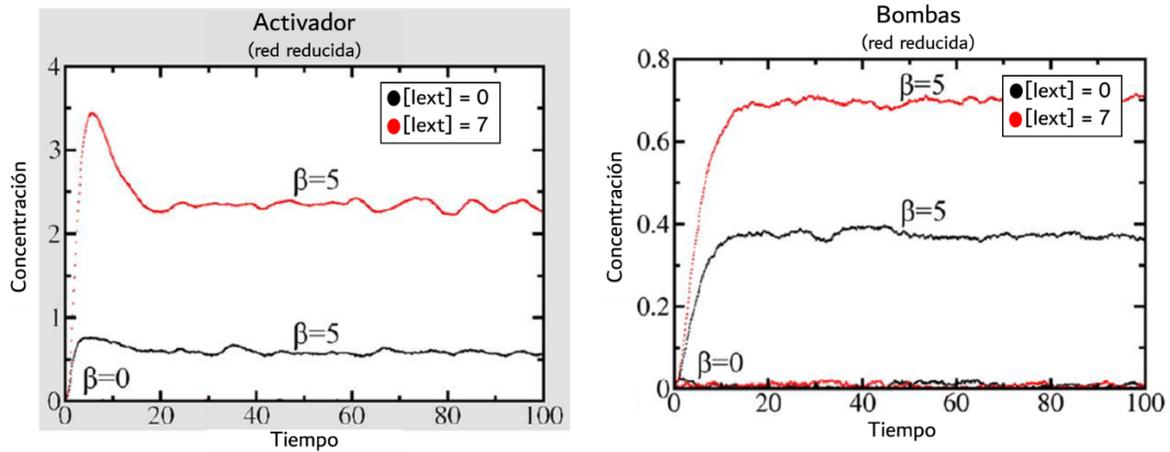


Figura 7. Simulación del comportamiento de la EPRN en una bacteria. Expresión del activador y de las bombas en presencia y ausencia de antibiótico (líneas rojas [$I_{ext} = 7$], líneas negras [$I_{ext} = 0$] respectivamente). Cuando la tasa de transcripción (β_0) es igual a 5, el sistema responde a la presencia de antibiótico, y aumenta la expresión del activador que promueve la síntesis de bombas de flujo para disminuir la concentración de antibiótico en el interior de la célula. Tomado de Motta *et al.*, 2015.

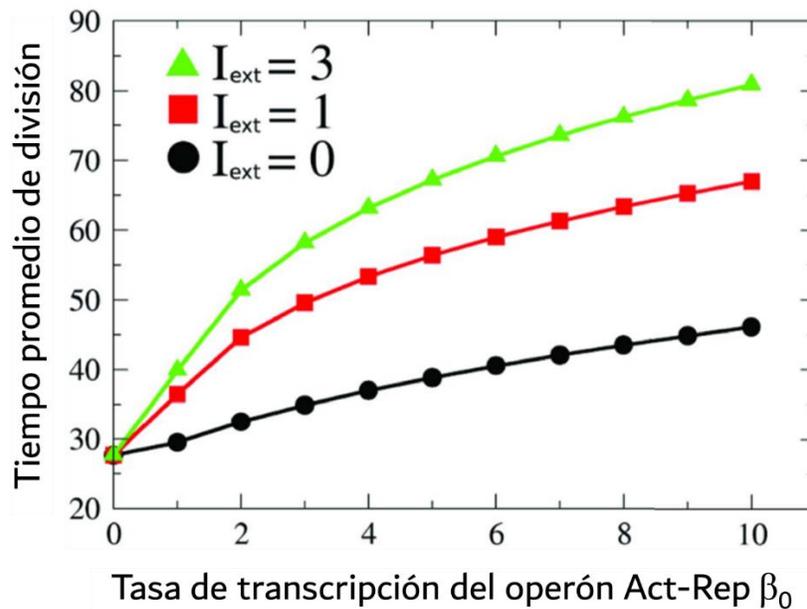


Figura 8. Tiempo de división como función de la tasa de transcripción β_0 a diferentes concentraciones de antibiótico. Cada punto representa el tiempo promedio de división de 1,000 eventos de división celular (el promedio es necesario por la presencia de ruido). Podemos ver como el tiempo de división aumenta conforme β_0 y la concentración de antibiótico incrementan, es decir, la producción de bombas de flujo implica un costo para la bacteria, pues ésta tarda más en alcanzar la concentración de nutrientes que necesita para dividirse porque las bombas de flujo no sólo expulsan antibiótico, sino también nutrientes. Tomado de Motta *et al.*, 2015.

EPRN en una población

Para reproducir el comportamiento de una población en presencia de antibiótico, se usó un conjunto de células, cada una representada por su propio sistema de ecuaciones que describe su EPRN. Si alguna de las células que conforman la población alcanza el umbral de nutrientes requeridos para reproducirse, esta bacteria se divide (da origen a dos células) y aumenta el tamaño de la población; pero si alcanza un determinado umbral de concentración de antibiótico en el interior de la célula, la bacteria muere, disminuyendo la cantidad de células de la población (Motta *et al.*, 2015).

Como se mencionó en la sección “AdR en el sistema AcrAB-TolC”, para que surja el fenotipo de AdR se necesita implementar en el modelo variabilidad fenotípica, herencia y cambios epigenéticos. Para ello vamos a centrarnos en dos parámetros: ε_1 (eficiencia de las bombas) y β_0 (tasa de transcripción máxima del operón activador-represor), que son los más importantes para disminuir la concentración de antibiótico en el interior de la célula. Un incremento en la eficiencia de las bombas para extruir el antibiótico (ε_1), puede deberse a que son más rápidas o a que tienen una mayor especificidad por el inductor, lo cual podría implicar un cambio estructural en el sistema AcrAB-TolC, por lo que en el presente modelo se asume que este tipo de cambios se da por mutaciones en la secuencia de DNA (modificaciones que se transmiten por herencia genética). En cuanto a los cambios en la expresión de bombas de eflujo (β_0), se asume que es por cambios en los patrones de metilación en la región regulatoria del operón activador-represor, donde se encuentran 12 sitios blanco de la enzima DAM, por lo que hay 2^{12} estados posibles de metilación, que podrían resultar en diferentes tasas de transcripción (modificaciones que se transfieren a las siguientes generaciones por herencia epigenética). Para asemejar la condición de variabilidad fenotípica, cada bacteria de la población inicial toma valores para ε_1 y β_0 de las distribuciones gaussianas $G(\mu_\varepsilon = 0.5, \sigma_\varepsilon^2 = 0.005)$ y $G(\mu_\beta = 0.5, \sigma_\beta^2 = 0.1)$ respectivamente (μ se refiere al promedio y σ^2 a la varianza). Al dividirse la bacteria, hereda estos parámetros como se muestra en la figura 9: en el tiempo t_0 , tenemos la distribución gaussiana (ya sea de ε_1 o de β_0) de la célula madre $G(\mu_0, \sigma_0^2)$, de la que la bacteria tomará un valor para su parámetro (ε_1 ó β_0), cuando la célula madre alcance el umbral de nutrientes necesario para dividirse dará origen a dos células hijas en el tiempo t_1 , cuya distribución gaussiana tendrá como promedio el valor del parámetro (ε_1 ó β_0) de la célula madre y de la cual las células

hijas obtendrán un valor para su parámetro, de esta manera se correlacionan los valores de los parámetros a través de las generaciones con lo cual se implementa la herencia con cierta probabilidad de variación. Para distinguir entre herencia genética y herencia epigenética, se asignó un valor de $\sigma^2_\varepsilon = 0.005$ para la eficiencia de las bombas que tiene cambios por mecanismos genéticos, y un valor de $\sigma^2_\beta = 0.1$ para la tasa de expresión de las bombas que presenta modificaciones por mecanismos epigenéticos; estos valores permiten que la herencia epigenética suceda de forma más rápida que la herencia genética (Motta *et al.*, 2015).

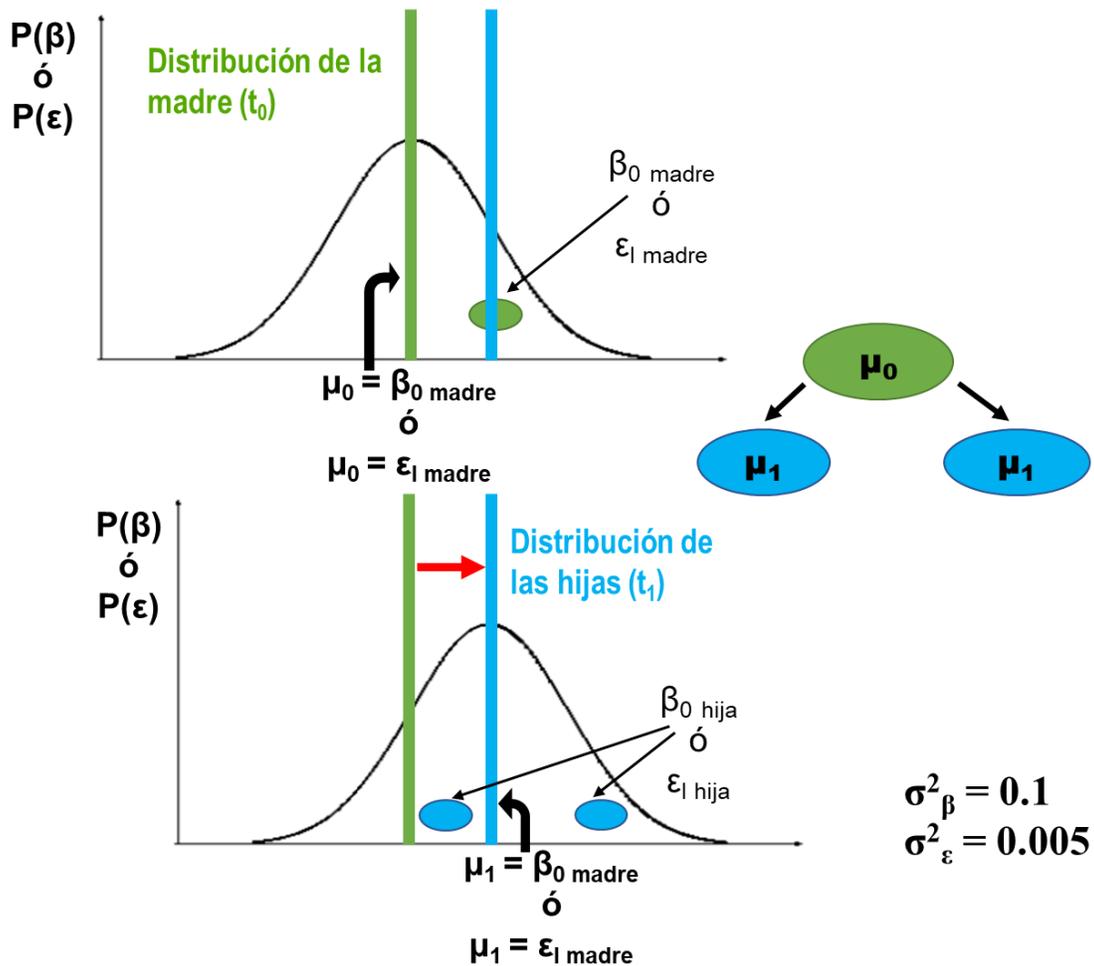


Figura 9. Herencia genética y epigenética en el modelo poblacional de EPRN. La bacteria (óvalo verde) toma un valor para su parámetro ε_I ó β_0 , de la distribución gaussiana $G(\mu_0, \sigma_0^2)$ en el tiempo t_0 , cuando esta célula se divide (célula madre) y da lugar a dos células hijas (óvalos azules), hereda el valor de sus parámetros con cierta probabilidad de variación, al pasar el valor de su parámetro como promedio a la distribución gaussiana de las células hijas, de la cual ambas bacterias obtendrán un valor para sus parámetros. Para distinguir entre herencia genética y epigenética, se utilizaron valores distintos para la varianza de la distribución.

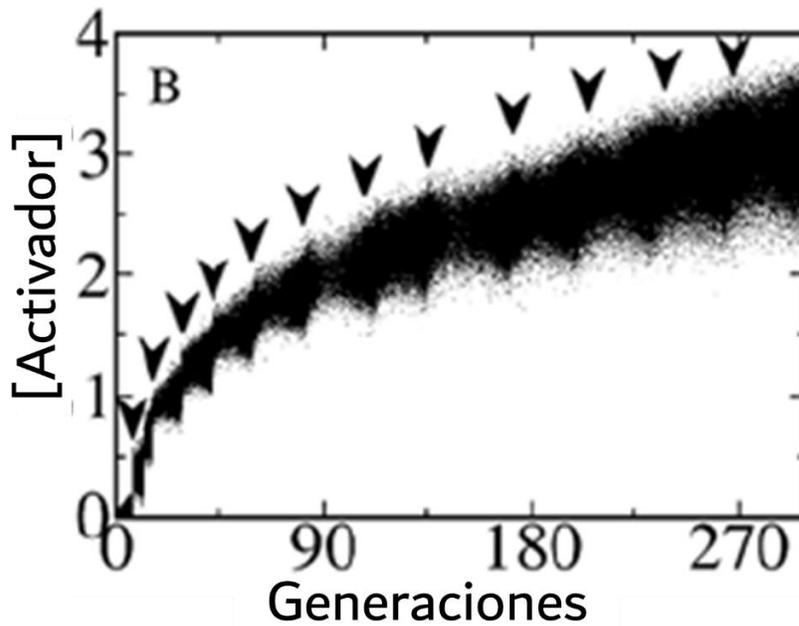


Figura 10. Simulaci3n del crecimiento de una poblaci3n de bacterias que se somete a dosis sucesivas de antibi3tico. Las flechas representan el suministro de una dosis X de antibi3tico. Conforme aumenta la cantidad de antibi3tico, incrementa tambi3n el nivel de expresi3n del activador, que repercute en una disminuci3n de la expresi3n de porinas y un aumento en la expresi3n de bombas de eflujo, lo que permite que las bacterias disminuyan la concentraci3n de antibi3tico en el interior de la c3lula, y vayan adquiriendo un fenotipo resistente. Tomado de Motta *et al.*, 2015.

En la figura 10 se observa el crecimiento de una poblaci3n con variabilidad, herencia gen3tica y epigen3tica, que se somete a dosis sucesivas de antibi3tico (experimento semejante al descrito en la secci3n “AdR en el sistema AcrAB-TolC” y representado en la figura 4). Las flechas indican los momentos en los que se suministra una dosis X de antibi3tico, de tal manera que en la generaci3n 270 hay una concentraci3n de antibi3tico igual a 12X. El criterio para aplicar una dosis de antibi3tico es que la poblaci3n de c3lulas alcance un tama1o de 5,000 bacterias, as3 que la poblaci3n se deja crecer hasta esta densidad y cuando la alcanza se le suministra una dosis de antibi3tico que mata a gran parte de la poblaci3n en las primeras generaciones, pero conforme pasa el tiempo y aumenta la concentraci3n de antibi3tico, tambi3n se incrementa la concentraci3n del activador (que inhibe la s3ntesis de porinas y promueve la expresi3n de bombas de eflujo), lo que repercute en un fenotipo resistente, de tal manera que en generaciones posteriores el antibi3tico que se administra logra matar a una proporci3n menor de bacterias. En la

imagen también se observa que los lapsos de tiempo que tarda la población en alcanzar un tamaño de 5,000 células, se incrementan cuando las bacterias alcanzan mayores niveles de resistencia (las flechas en las últimas generaciones se ven más separadas entre sí que en el tiempo inicial), lo que nos indica que la adquisición de resistencia tiene un costo para la célula (como se ve en la figura 8) (Motta *et al.*, 2015).

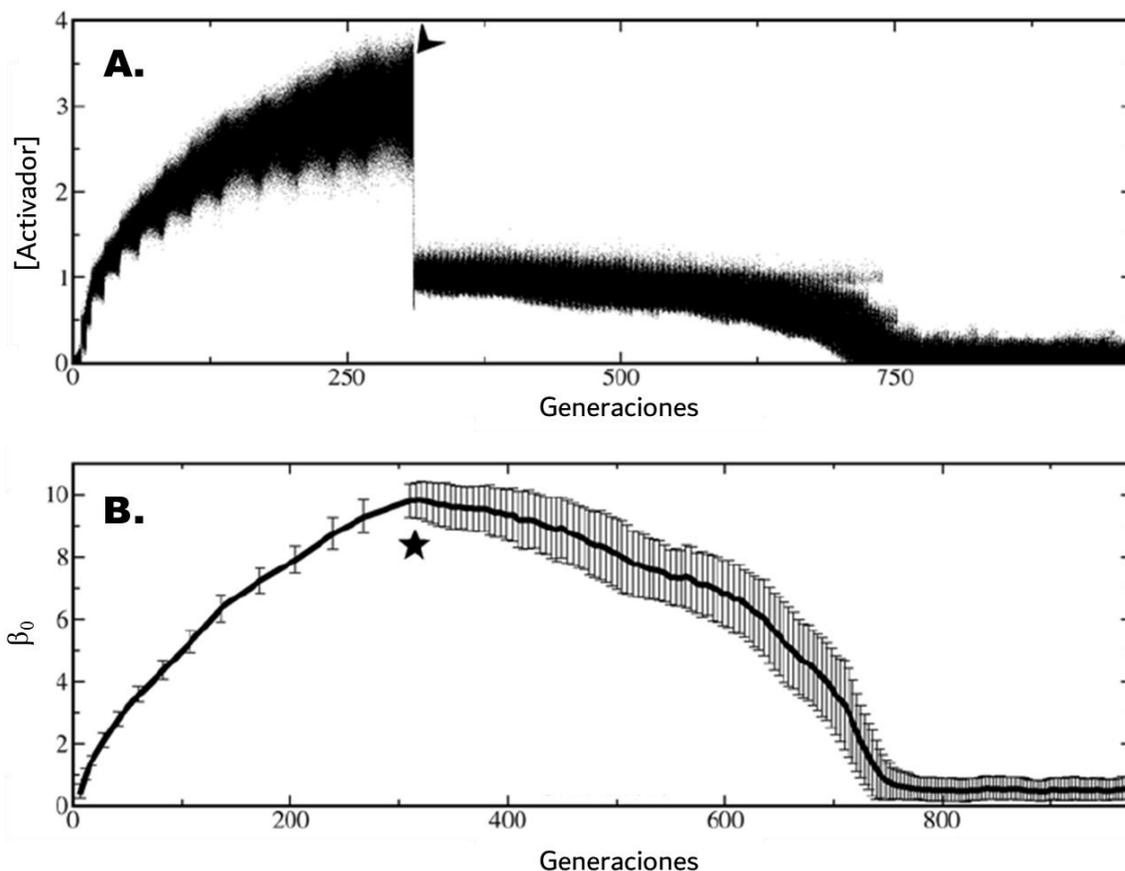


Figura 11. Reversibilidad del fenotipo de resistencia a antibiótico. A) La población recibe ~12 dosis de antibiótico y en la generación ~270 se elimina este inductor de la población (indicado en la gráfica por una flecha), entonces el activador disminuye inmediatamente su expresión y posteriormente alcanza su nivel inicial. B) La tasa de expresión máxima del operón activador-represor (β_0) de las bacterias que conforman la población, aumenta cuando se suministran las dosis sucesivas de antibiótico, al eliminar este compuesto del medio (indicado en la imagen con una estrella), la disminución de este parámetro ocurre de forma gradual también, hasta alcanzar valores semejantes a los iniciales, lo que señala que la resistencia al antibiótico es un fenotipo inestable. Tomado de Motta *et al.*, 2015.

Las características de la simulación muestran un fenotipo de AdR, por ejemplo, hay incremento gradual en la resistencia bacteriana a los antibióticos (provocado por un incremento gradual en la concentración de activador), un aumento en el nivel de resistencia

aparece después de inducir la expresión de bombas de eflujo con el antibiótico, pero hace falta verificar si el fenotipo obtenido en la simulación también es reversible, para ello se elimina el antibiótico de la población después de alcanzar una concentración máxima de 12X y se obtienen los resultados de la figura 11.

En el panel A de la figura 11 vemos como al eliminar el antibiótico del medio en la generación ~270, la concentración del activador disminuye rápidamente, pues en ausencia de inductor ya no se fomenta su síntesis, sin embargo, para asegurarnos de que el fenotipo de esta simulación es reversible, debe verse la evolución del parámetro β_0 , el cual aumenta gradualmente cuando se aplican dosis sucesivas de antibiótico a la población, y al quitar el inductor, también va disminuyendo de forma gradual hasta alcanzar valores semejantes a los iniciales. Cuando las células que ya recuperaron valores de β_0 cercanos a cero (como al inicio de la simulación), se sometan nuevamente a la presencia de antibiótico, van a tener que adaptarse nuevamente a este estrés, incrementando su valor de β_0 , lo que les permitirá un fenotipo más resistente (al expresar mayor cantidad de bombas y disminuir la cantidad de porinas), es decir, el fenotipo de resistencia se revierte al eliminar la presión de selección (Motta *et al.*, 2015).

Con estos resultados Motta *et al.*, concluyen que el modelo reproduce un fenotipo de AdR, ante un escenario donde se expone a la población a dosis sucesivas de antibiótico.

EPRN en un gradiente

Los gradientes espaciales de concentraciones de antibiótico son otra forma de poner en contacto a una población bacteriana a dosis subinhibitorias de antibiótico, por lo que suponemos que bajo este escenario también se obtendrá un fenotipo de AdR.

Un trabajo experimental que muestra la evolución de la resistencia a antibióticos en un gradiente exponencial (Baym *et al.*, 2016), propone que las mutaciones son el mecanismo que permite a las bacterias colonizar el gradiente, pero que las regiones que tienen concentraciones bajas de antibiótico son las que permiten a las bacterias adaptarse a las concentraciones altas de antibiótico, pues si éstas no existen, las células no tienen el mismo éxito al colonizar concentraciones de antibiótico elevadas.

Este caso de los gradientes, también es de interés estudiarlo, porque los gradientes los encontramos de manera natural en: 1) la formación de biopelículas, donde las capas más internas de esta estructura tienen menor contacto con el medio porque la penetración de las sustancias está limitada, incluyendo los nutrientes, por lo que las bacterias del interior de la biopelícula, además de no entrar en contacto con niveles de antibiótico elevados, tienen tasas de crecimiento menores que las del exterior, lo cual significa que los patrones de expresión en las células que forman parte de la población son distintos originando niveles de resistencia diferentes (Sandoval-Motta y Aldana, 2016) y 2) los parámetros farmacocinéticos varían entre diferentes órganos y tejidos, lo que provoca que las concentraciones de antibiótico no estén distribuidas homogéneamente en el espacio (Elliott *et al.*, 1995).

Por estas razones se simuló el comportamiento de las bacterias en un gradiente lineal o exponencial de antibiótico, adecuando el modelo presentado por Motta *et al.*, 2015.

HIPÓTESIS

Dado que el modelo de la red regulatoria de bombas de eflujo logró obtener el fenotipo de AdR en el escenario de exposiciones sucesivas a antibióticos, al implementar este mismo modelo en el escenario de gradientes de concentración de antibióticos, las bacterias migrarán gradualmente a concentraciones mayores de antibiótico, obteniendo así el fenotipo de AdR.

OBJETIVOS

Objetivo general

Implementar el modelo de la red regulatoria de bombas de eflujo en un gradiente de concentraciones de antibiótico.

Objetivos particulares

Comparar el comportamiento de las poblaciones de bacterias en un gradiente lineal con el de un gradiente exponencial.

METODOLOGÍA

Se utilizó JAVA, un lenguaje de programación orientado a objetos, para crear un objeto célula, un objeto población y un objeto gradiente (figura 12).

El objeto célula contiene un método dinámico que itera, por el método numérico de Euler, las ecuaciones diferenciales que describen el comportamiento de la EPRN, lo que nos permite conocer cómo cambia el estado de una célula del tiempo t_0 al tiempo t_N .

El objeto población es un conjunto de células, donde cada una de ellas posee su propia EPRN. Contiene un método evolutivo, el cual nos permite observar cómo se modifica el estado de la población a través del tiempo, dependiendo de la concentración de antibiótico en el medio. Las células mueren si la concentración de antibiótico en el interior de la célula alcanza cierto valor (Θ_i) y se reproducen si alcanzan un umbral de comida (Θ_F), “heredando” con cierta probabilidad de variación los parámetros β_0 y ε_i , mediante correlaciones entre los promedios de las distribuciones gaussianas de las cuales β_0 y ε_i toman su valor.

El objeto gradiente es un conjunto de poblaciones, cada una, sometida a una concentración de antibiótico distinta. El gradiente es discreto y puede ser lineal o exponencial. Se coloca una población de células en región que tiene la concentración más baja de antibiótico y una vez que las células alcanzan un tamaño igual a la capacidad de carga de esta región, se seleccionan aleatoriamente algunas bacterias que intentan invadir el siguiente espacio que tiene una dosis de antibiótico mayor, sin embargo para lograrlo deben tener las condiciones adecuadas que les permitan sobrevivir, es decir valores de β_0 y ε_i que les permitan colonizar esa concentración de antibiótico más alta, si no lo logran en la primera oportunidad, continúan migrando hasta conseguir establecerse en ese nicho. De tal manera que con este objeto podemos ver el proceso de colonización en un gradiente.

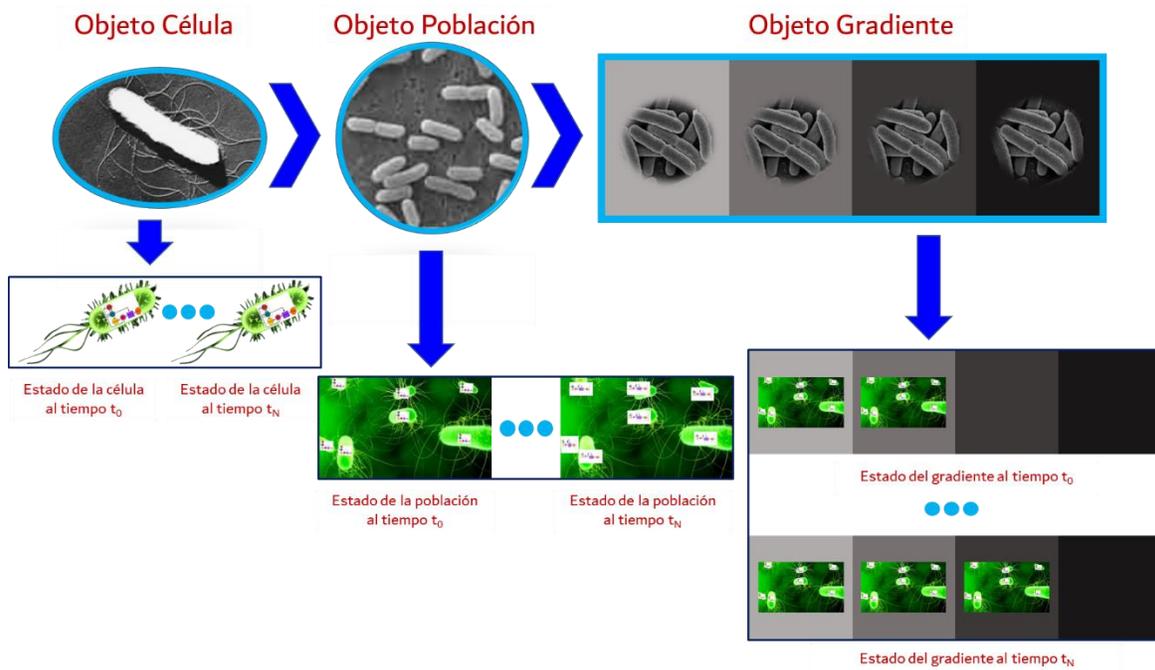


Figura 12. Descripción del programa utilizado para simular el comportamiento de bacterias en un gradiente de antibiótico. Se usó un lenguaje de programación orientado a objetos y se construyó un objeto célula cuyo estado estaba dado por la EPRN, las células se agruparon en un objeto población para poder conocer su comportamiento en presencia de antibiótico y finalmente en un objeto gradiente se reunieron poblaciones, donde cada una estaba sometida a una dosis de antibiótico distinta (la cual podía aumentar de manera lineal o exponencial).

Los resultados que se presentan en esta tesis tienen el formato que se observa en la figura 13. En el eje X se encuentran las concentraciones de antibiótico que tienen las regiones del gradiente, las cuales van de menor a mayor. En el eje Y, se observa como cambia la expresión promedio de la concentración de activador en la población de bacterias, o bien, como varía el promedio de los parámetros β_0 y ϵ_1 de las bacterias que son parte de la población, conforme la concentración de antibiótico en el ambiente aumenta.

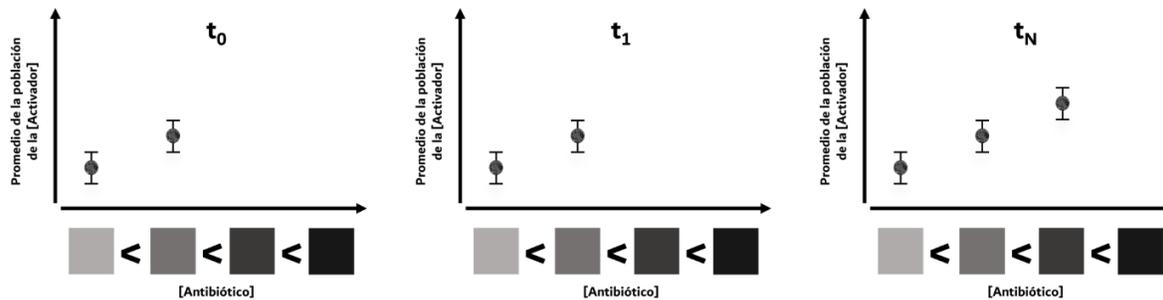


Figura 13. Formato de los resultados obtenidos en este trabajo. En el eje X, se observa la concentración de antibiótico que tiene cada región del gradiente, las cuales están ordenadas de tal forma que la concentración de antibiótico en una región es mayor que la región anterior pero menor que la región siguiente (indicado con el símbolo < en la imagen). Para colonizar el gradiente se inoculan bacterias en la primera región del gradiente (que tiene la menor concentración de antibiótico), y una vez que esta región alcanza su capacidad de carga, las bacterias tratan de colonizar la siguiente región (cuya concentración de antibiótico es mayor), pero sólo lo pueden lograr si sus parámetros de β_0 y ϵI son los adecuados para adaptarse a este ambiente, cuando esto sucede las bacterias colonizan esta región del gradiente y el mismo proceso continúa hasta que se colonizan todas las regiones del gradiente, de manera que en cada región del gradiente tenemos un conjunto de bacterias, es decir, una población de bacterias. Así que lo que se grafica en el eje Y, es el valor promedio que la población bacteriana tiene la expresión del activador (como se observa en la imagen), pero también se graficaron los valores promedio de los parámetros β_0 y ϵI , ya que de éstos depende el eflujo de antibiótico de la célula. Para saber cómo cambian estos valores conforme las bacterias van colonizando el gradiente, graficamos a diferentes tiempos (generaciones) el estado del gradiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para comprobar que nuestro programa que simula el comportamiento de las bacterias en un gradiente de antibiótico estuviera funcionando adecuadamente, primero se reprodujeron los resultados obtenidos por Motta *et al.*, 2015 para una sola célula (Apéndice A, figuras A1 y A2) y para una población (Apéndice A, figura A3).

Posteriormente se simuló el comportamiento de las bacterias en gradientes lineales con incrementos de 2 (figura 14-16), 5 (figura 17-19) y 10 unidades (figura 20-22), y en gradientes exponenciales con bases de 2 (figura 23-25), 5 (figura 26-28) y 10 unidades (figura 29-31).

En el caso de los gradientes lineales se observa que la expresión promedio del activador incrementa de manera gradual conforme la población va colonizando concentraciones de antibiótico más elevadas (figura 14, 17 y 20), alcanzando un nivel cercano a 5 unidades en todos los casos. Cuando las bacterias que lograron colonizar la concentración más alta del gradiente se crecieron en un medio sin antibiótico, rápidamente cae la expresión del activador en 3 unidades aproximadamente, y en otras 200 a 400

generaciones aproximadamente, la expresión del activador vuelve a sus valores iniciales (figura 14F, 17D, 20C). En cuanto a su parámetro β_0 , aumenta lentamente conforme la concentración de antibiótico incrementa (figura 15, 18 y 21) y cuando las células crecen sin antibiótico, el valor de β_0 decrece paulatinamente de 200 a 400 generaciones (figura 15F, 18D y 21C). Por último, su parámetro ε_i , aumenta su valor en las primeras concentraciones de antibiótico (figura 16, 19, 22) y permanece constante incluso después de eliminar el antibiótico del medio (figura 16F, 19D y 22C). Si comparamos los tiempos en los que los gradientes logran colonizar concentraciones similares, observamos que mientras más pequeños sean los incrementos, se coloniza en un tiempo menor la siguiente concentración de antibiótico, por ejemplo deben pasar ~709 generaciones para que las bacterias colonicen la concentración de antibiótico 10 en un gradiente que va incrementado de 10 en 10, mientras que sólo pasan ~251 generaciones para que las células colonicen una concentración de 16 unidades en un gradiente cuyo incremento es de 2. Es decir, concentraciones bajas de antibiótico permiten que la bacteria se adapte a concentraciones más altas de antibiótico de forma más rápida.

En los gradientes exponenciales el comportamiento de las células es distinto: el activador incrementa su expresión de manera exponencial con valores máximos de entre 3 y 4 unidades (figura 23, 26 y 29), pero al igual que sucede con los gradientes lineales, una vez que se elimina el antibiótico del medio, el nivel de expresión del activador disminuye abruptamente entre 2 y 4 unidades, hasta alcanzar su nivel de expresión basal alrededor de 100 generaciones después (figura 23E, 26E y 29D). Su parámetro β_0 , aumenta cuando se va a colonizar la siguiente concentración de antibiótico, pero disminuye una vez que se colonizó, y alcanza niveles máximos de entre 9 y 18 unidades (figura 24, 27 y 30), pero al eliminar el antibiótico del medio su valor baja a sus valores iniciales en ~100 generaciones (figura 24E, 27E y 30D). En el caso del parámetro ε_i , en un principio aumenta su valor lentamente, pero al avanzar el tiempo, su valor se incrementa rápidamente, es el parámetro que menor variabilidad tiene (figura 25, 28 y 31) y a pesar de que se elimine el antibiótico del medio, su valor se mantiene constante (figura 25E, 28E y 31D).

A pesar de que existen modelos que describen el comportamiento de las poblaciones bacterianas en gradientes de antibiótico (Hermsen *et al.*, 2012), el modelo construido por Motta *et al.*, 2015 toma en cuenta los aspectos biológicos que dan lugar a un fenotipo de AdR y de multi-resistencia, lo que nos permite obtener resultados similares

a los experimentales como los de Adam *et al.*, 2008 y los de Baym *et al.*, 2016. En el primer trabajo se reportó el surgimiento de un fenotipo de AdR cuando las bacterias se sometían a incrementos graduales de concentración de antibiótico (por ejemplo, exposiciones sucesivas a dosis de antibiótico y gradientes lineales) y en el segundo se reportó que las bacterias podían colonizar gradientes con concentraciones de antibiótico que aumentaran de manera exponencial, si mutaban. Ambos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, pues los gradientes lineales muestran un incremento significativo en la tasa de expresión de las bombas de eflujo, mientras que en los gradientes exponenciales lo que aumenta en gran medida es la eficiencia de las bombas. Además, pareciera que la AdR permite a las bacterias que colonizan gradientes exponenciales, sobrevivir en un inicio para posteriormente desarrollar mecanismos por medio de mutaciones, que les permitan adaptarse a esos nuevos ambientes, es decir como si la AdR, actuara como un puente entre los mecanismos rápidos y transitorios y los mecanismos lentos y estables (Sandoval-Motta y Aldana, 2016).

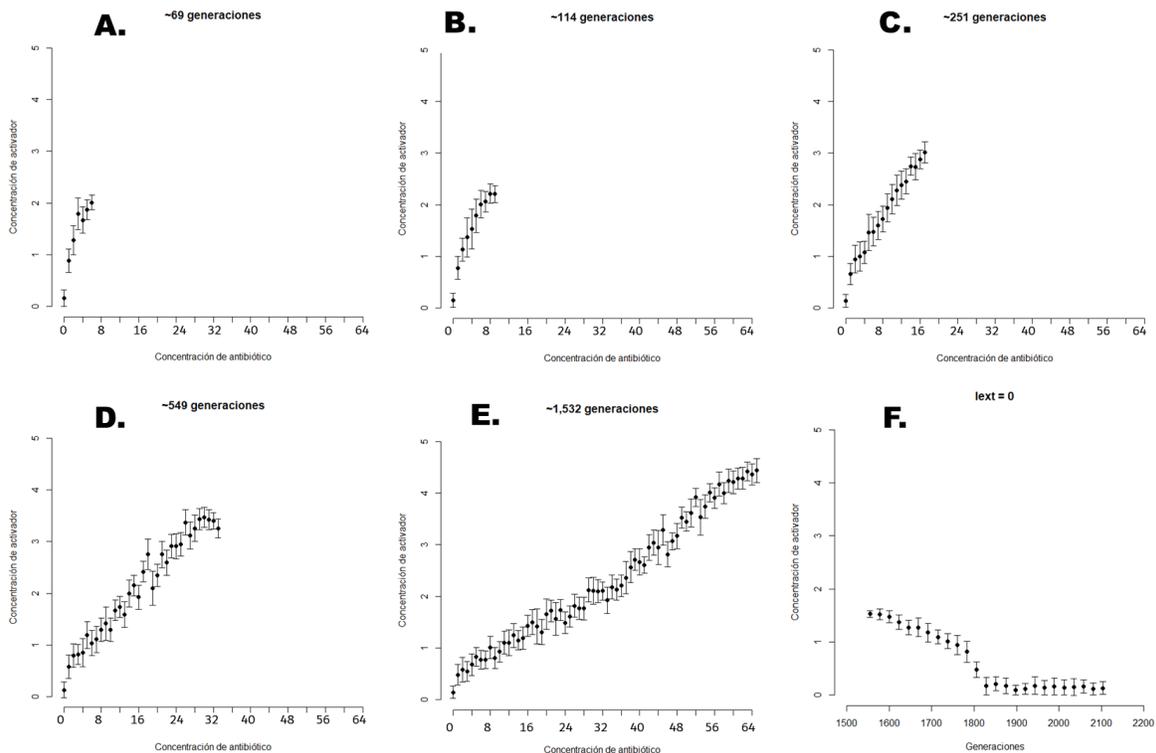


Figura 14. Expresión del activador en un gradiente lineal con un incremento de 2 unidades. Las gráficas A-E, indican la expresión promedio del activador en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. F) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 128 unidades, en un medio sin antibiótico.

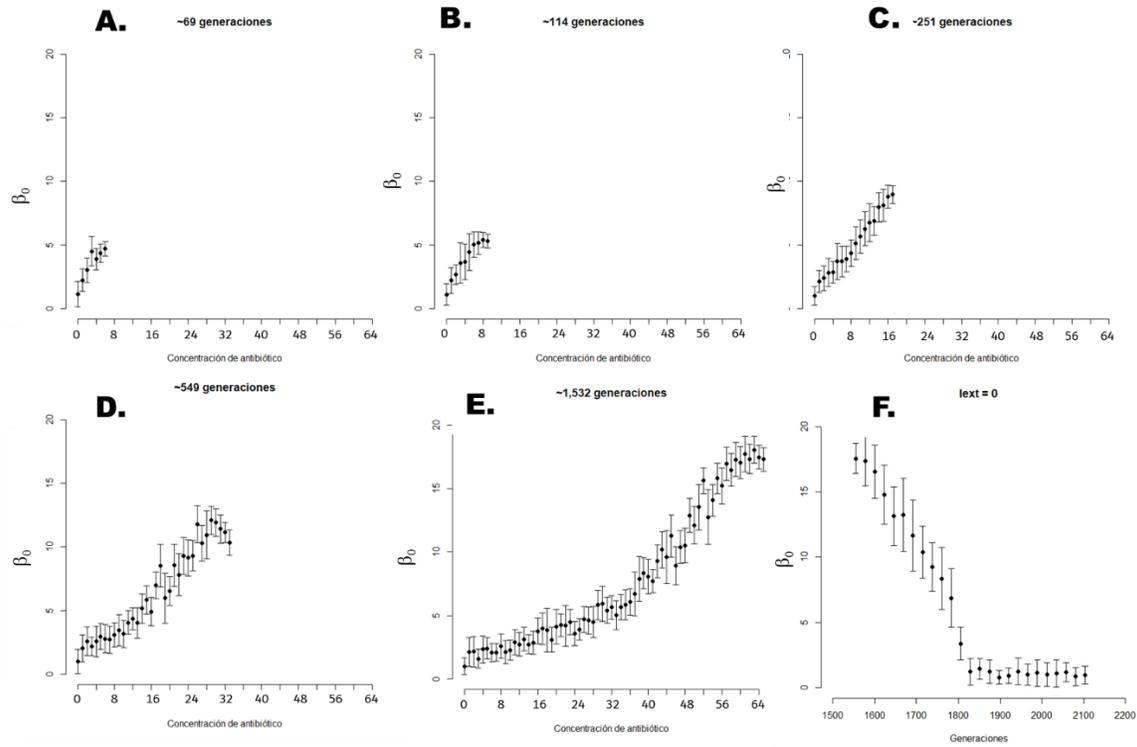


Figura 15. Valores que adquiere β_0 en un gradiente lineal con un incremento de 2 unidades. Las gráficas A-E, indican el valor promedio de β_0 en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. F) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 128 unidades, en un medio sin antibiótico.

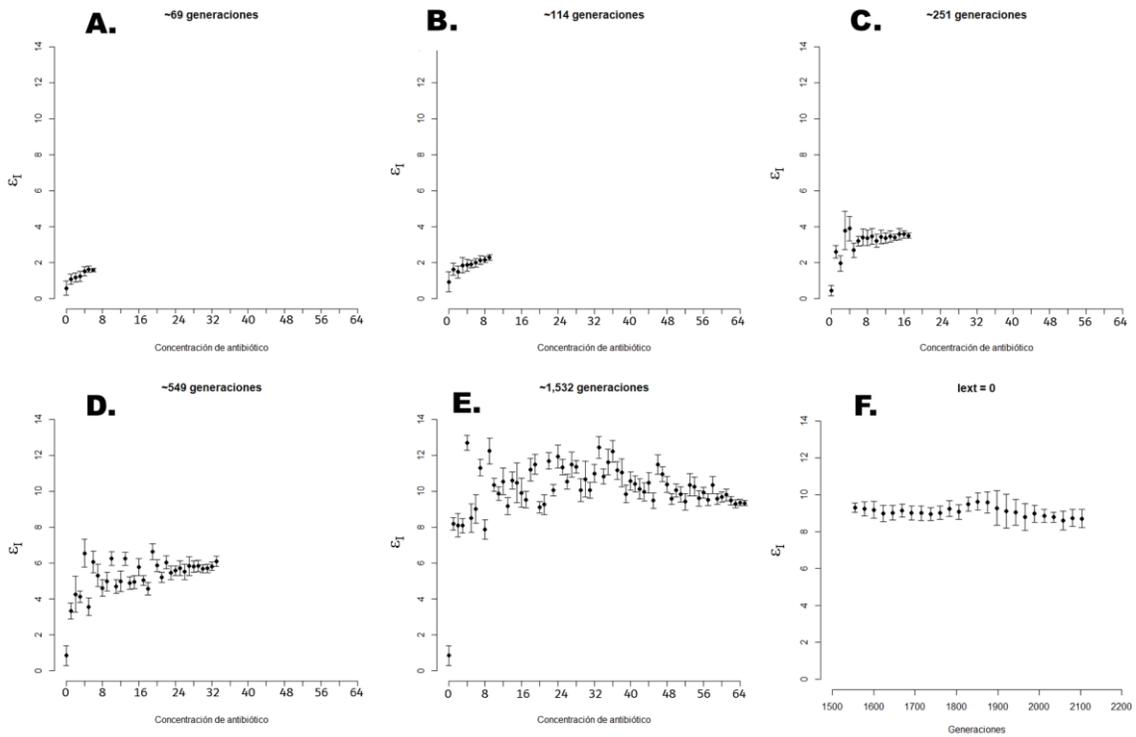


Figura 16. Valores que adquiere ϵ_i en un gradiente lineal con un incremento de 2 unidades. Las gráficas A-E, indican el valor promedio de ϵ_i en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. F) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 128 unidades, en un medio sin antibiótico.

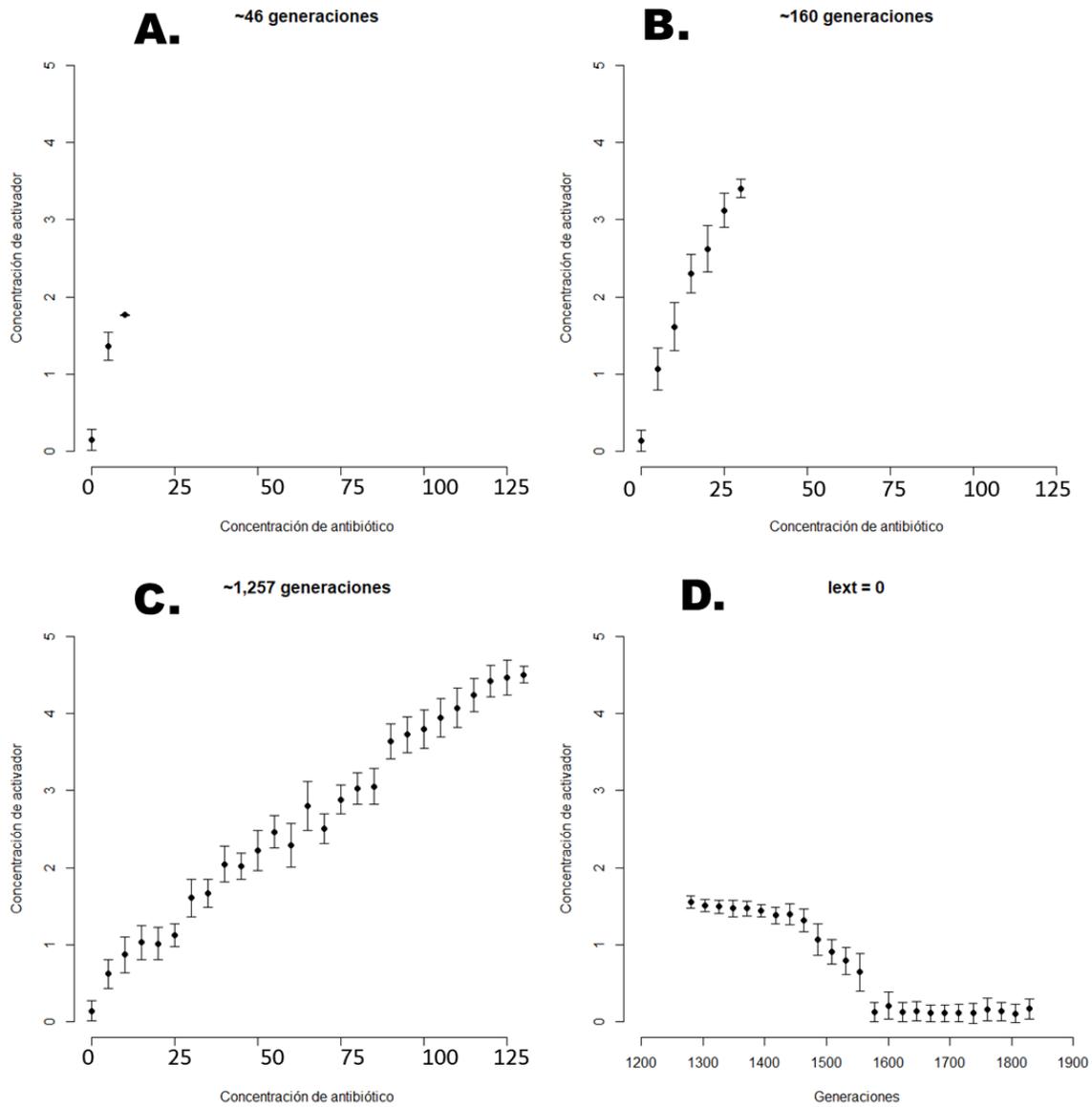


Figura 17. Expresión del activador en un gradiente lineal con un incremento de 5 unidades. Las gráficas A-C, indican la expresión promedio del activador en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. D) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 125 unidades, en un medio sin antibiótico.

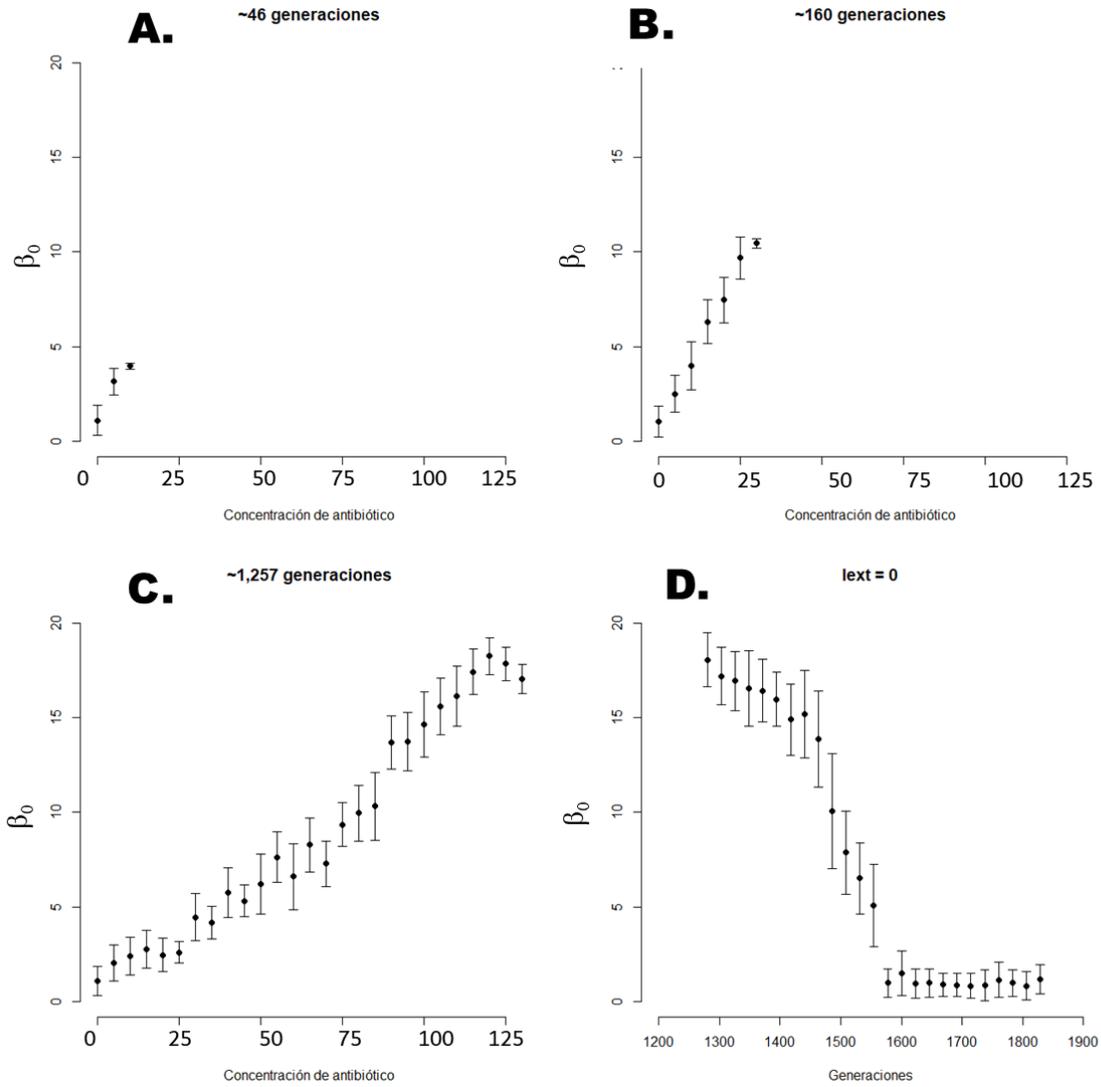


Figura 18. Valores que adquiere β_0 en un gradiente lineal con un incremento de 5 unidades. Las gráficas A-C, indican el valor promedio de β_0 en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. D) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 125 unidades, en un medio sin antibiótico.

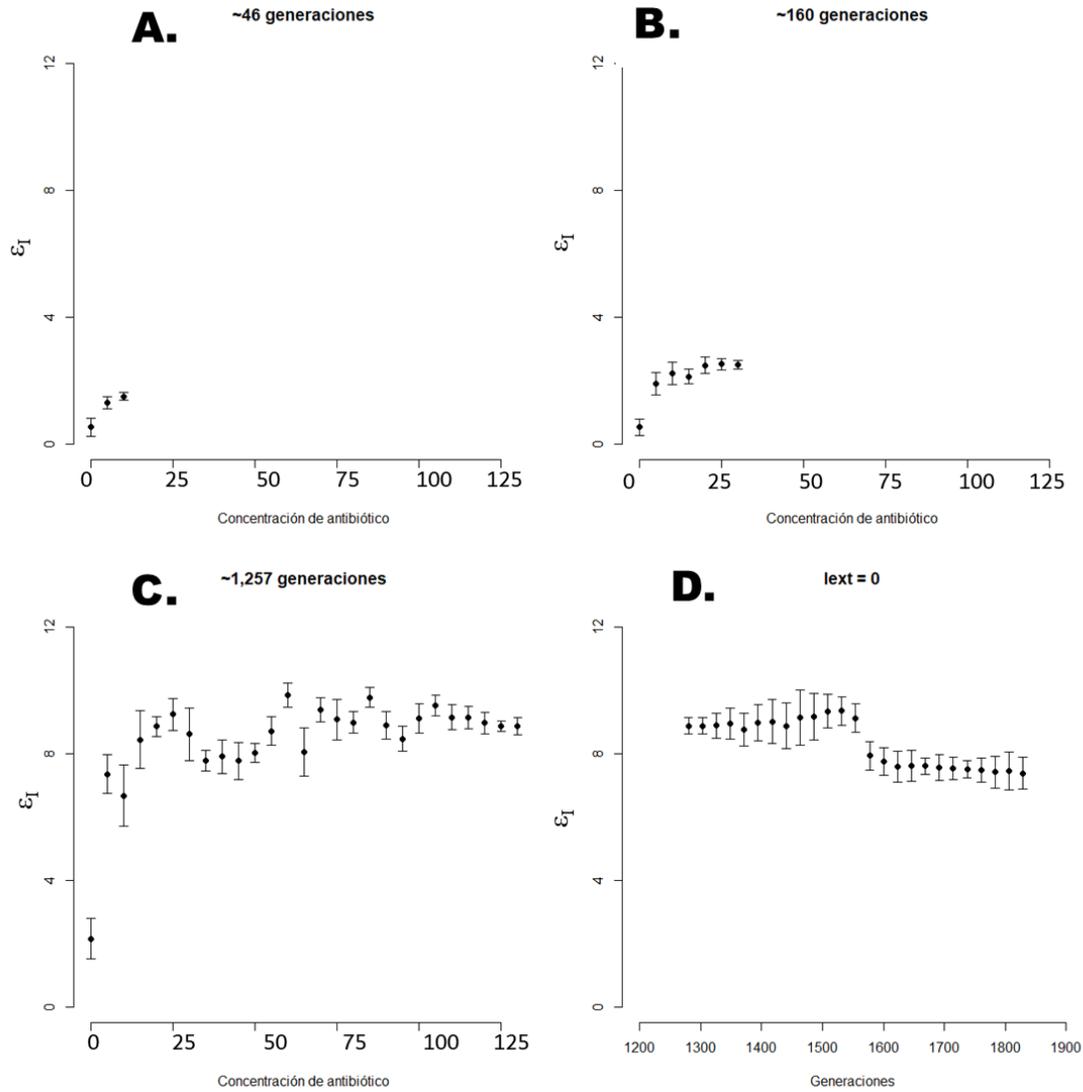


Figura 19. Valores que adquiere ϵ_I en un gradiente lineal con un incremento de 5 unidades. Las gráficas A-C, indican el valor promedio de ϵ_I en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. D) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 125 unidades, en un medio sin antibiótico.

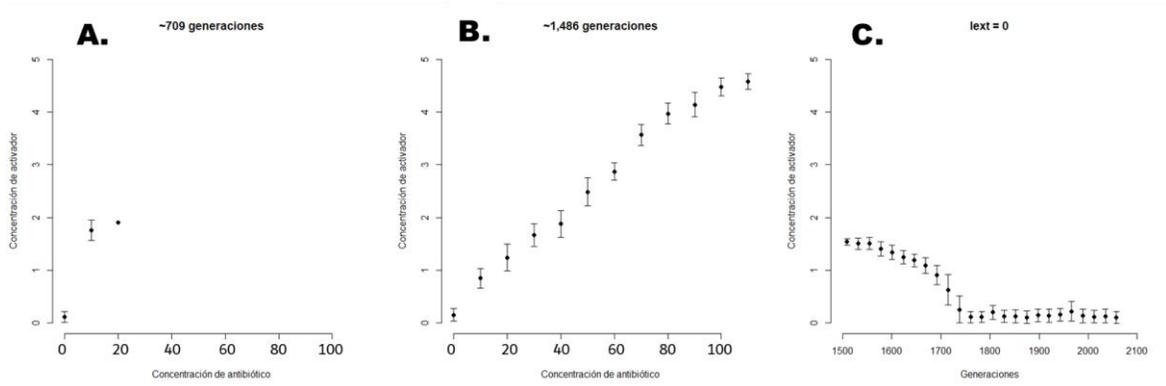


Figura 20. Expresión del activador en un gradiente lineal con un incremento de 10 unidades. Las gráficas A y B, indican la expresión promedio del activador en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. C) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 100 unidades, en un medio sin antibiótico.

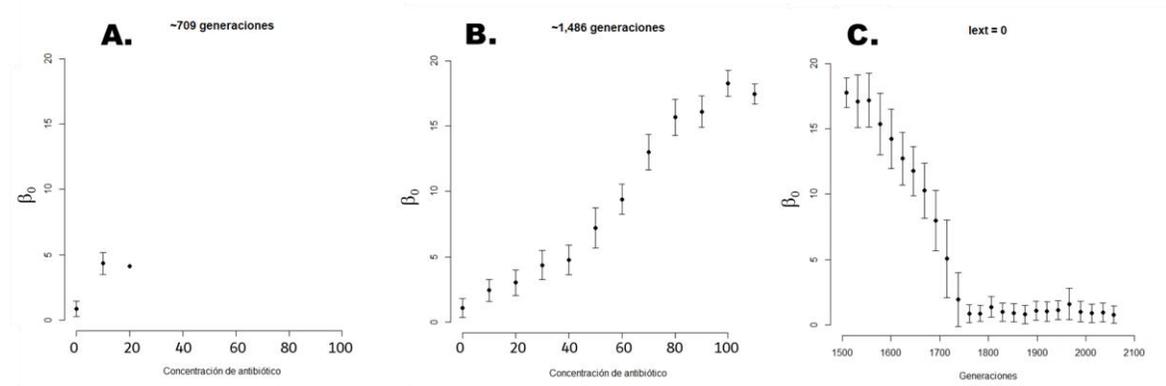


Figura 21. Valores que adquiere β_0 en un gradiente lineal con un incremento de 10 unidades. Las gráficas A y B, indican el valor promedio de β_0 en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. C) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 100 unidades, en un medio sin antibiótico.

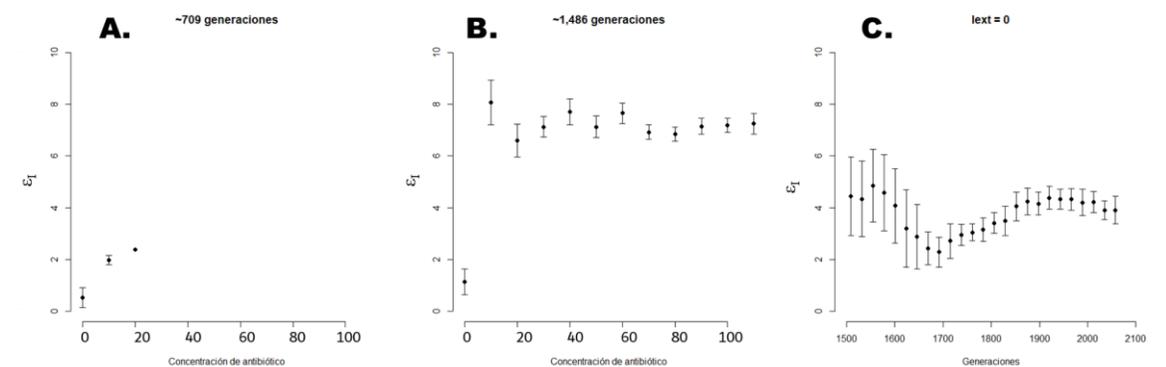


Figura 22. Valores que adquiere EI en un gradiente lineal con un incremento de 10 unidades. Las gráficas A y B, indican el valor promedio de EI en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. C) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 100 unidades, en un medio sin antibiótico.

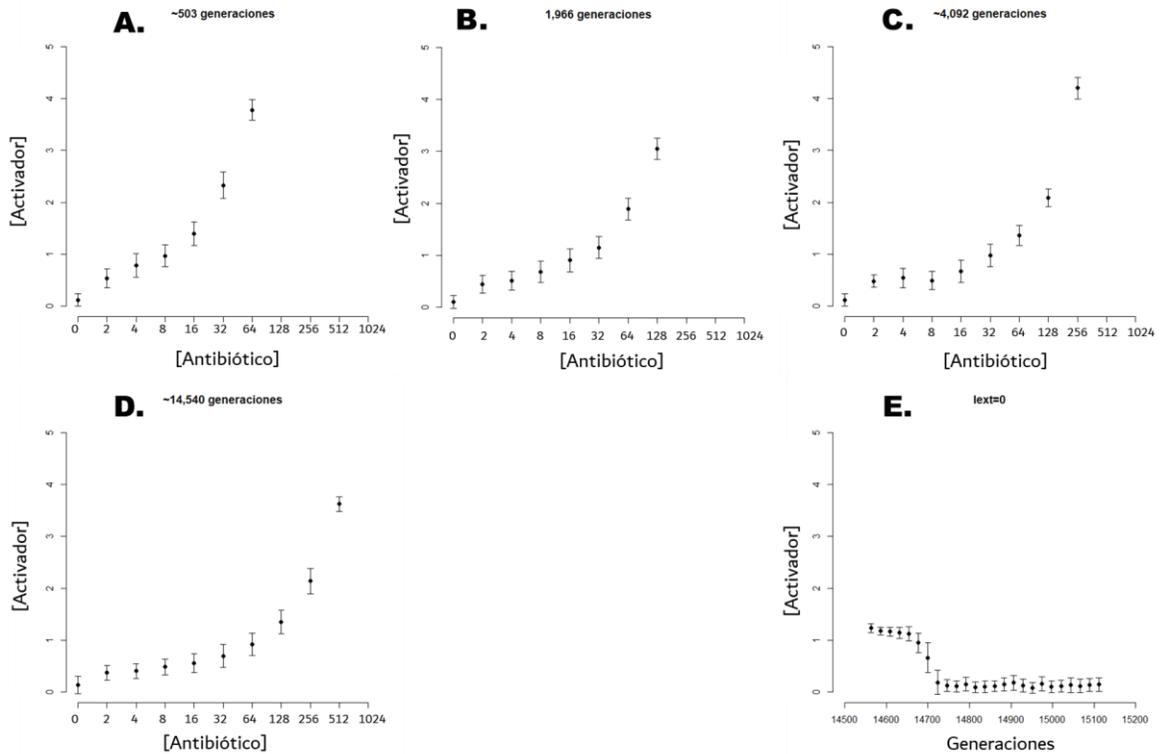


Figura 23. Expresión del activador en un gradiente exponencial con base igual a 2 unidades. Las gráficas A-D, indican la expresión promedio del activador en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. E) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 512 unidades, en un medio sin antibiótico.

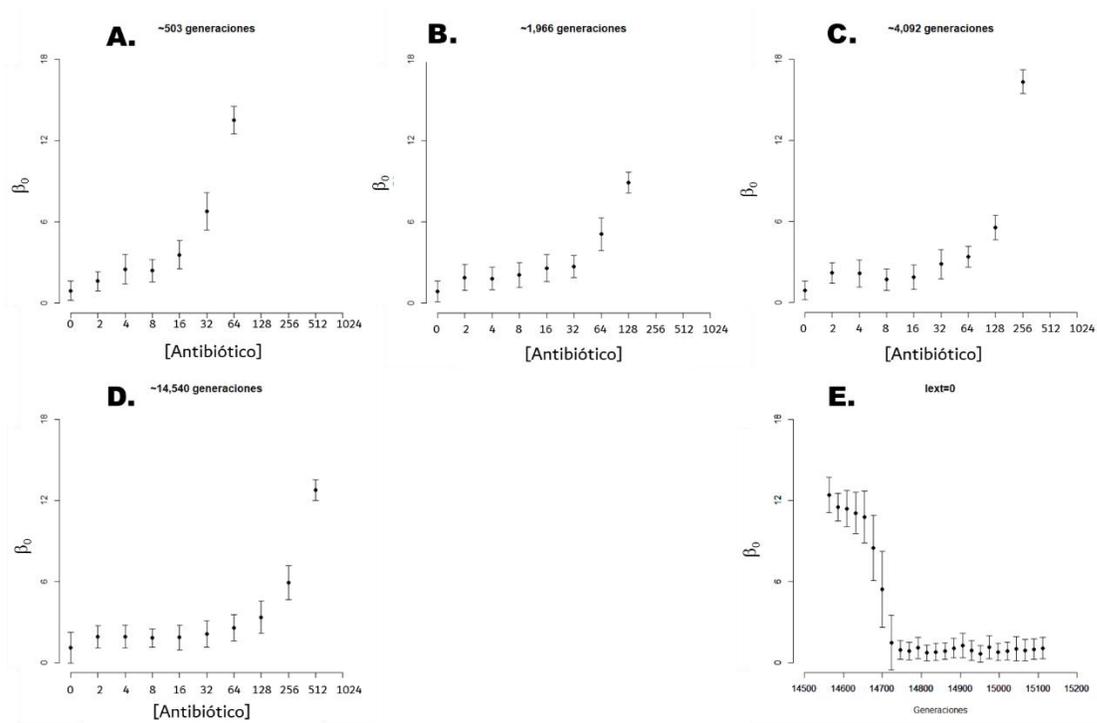


Figura 24. Valores que adquiere β_0 en un gradiente exponencial con una base igual a 2 unidades. Las gráficas A-D, indican el valor promedio de β_0 en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. E) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 512 unidades, en un medio sin antibiótico.

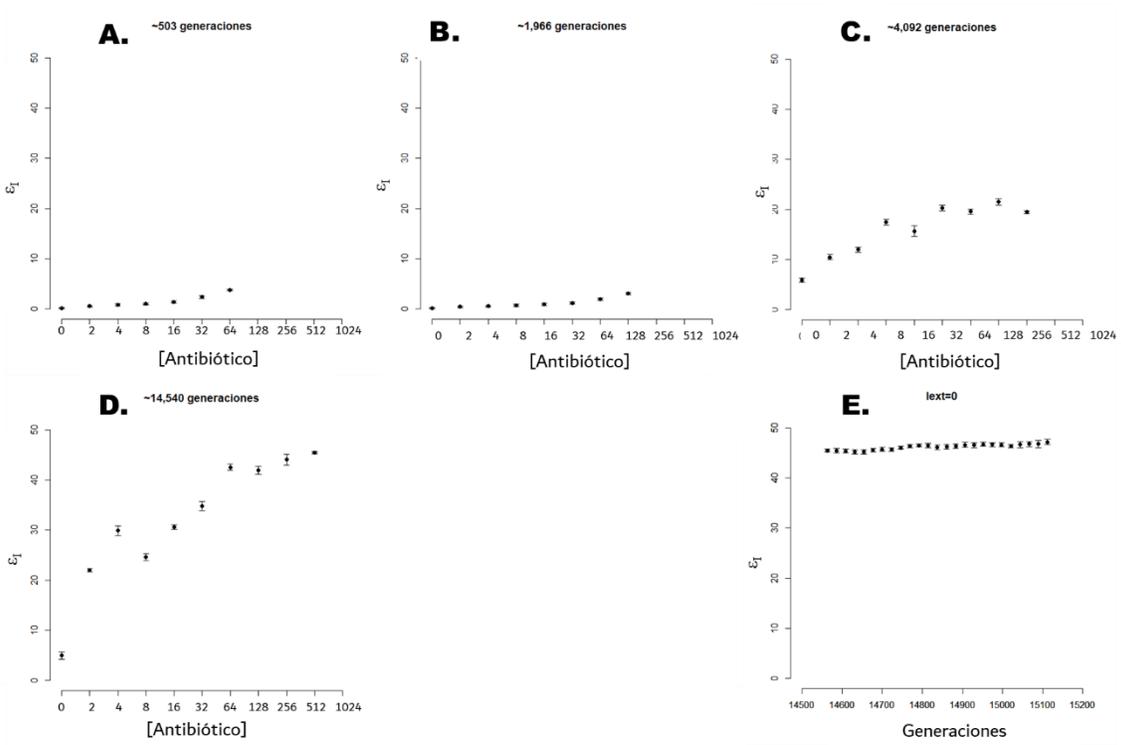


Figura 25. Valores que adquiere EI en un gradiente exponencial con una base igual a 2 unidades. Las gráficas A-D, indican el valor promedio de EI en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. E) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 512 unidades, en un medio sin antibiótico.

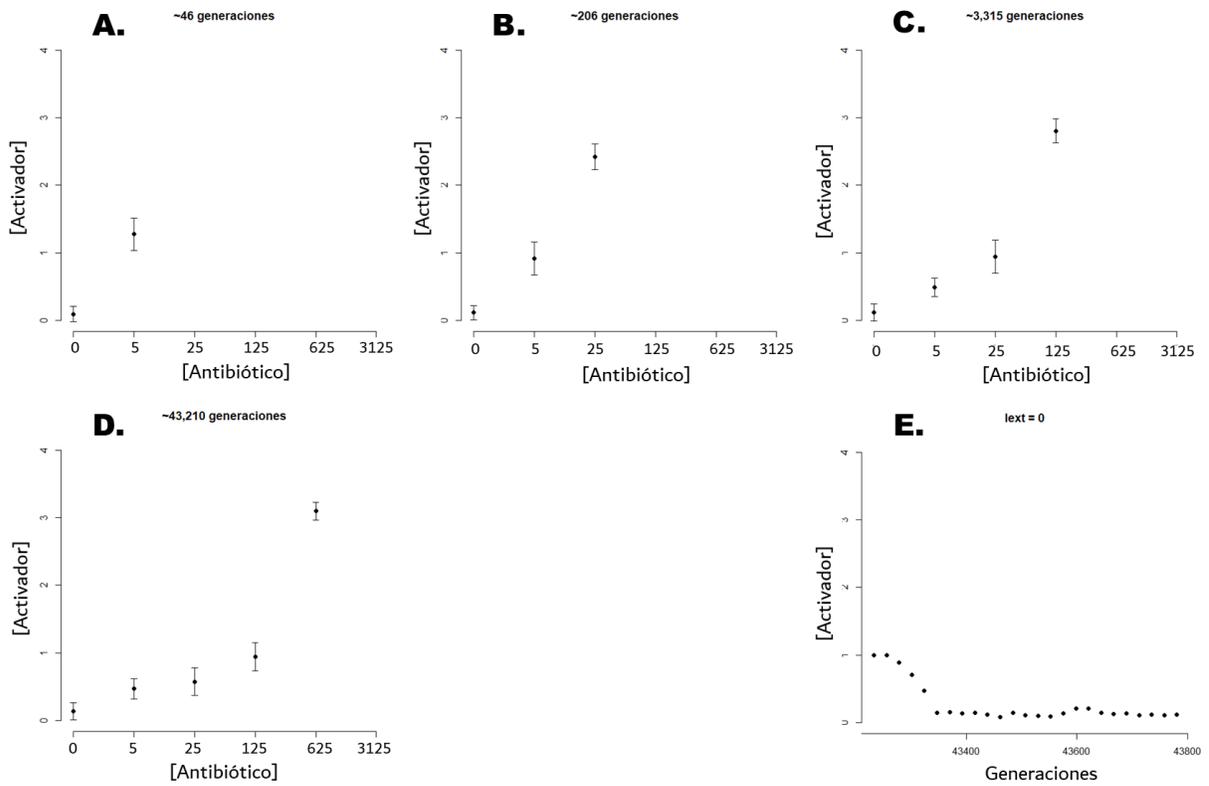


Figura 26. Expresión del activador en un gradiente exponencial con base igual a 5 unidades. Las gráficas A-D, indican la expresión promedio del activador en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. E) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 625 unidades, en un medio sin antibiótico.

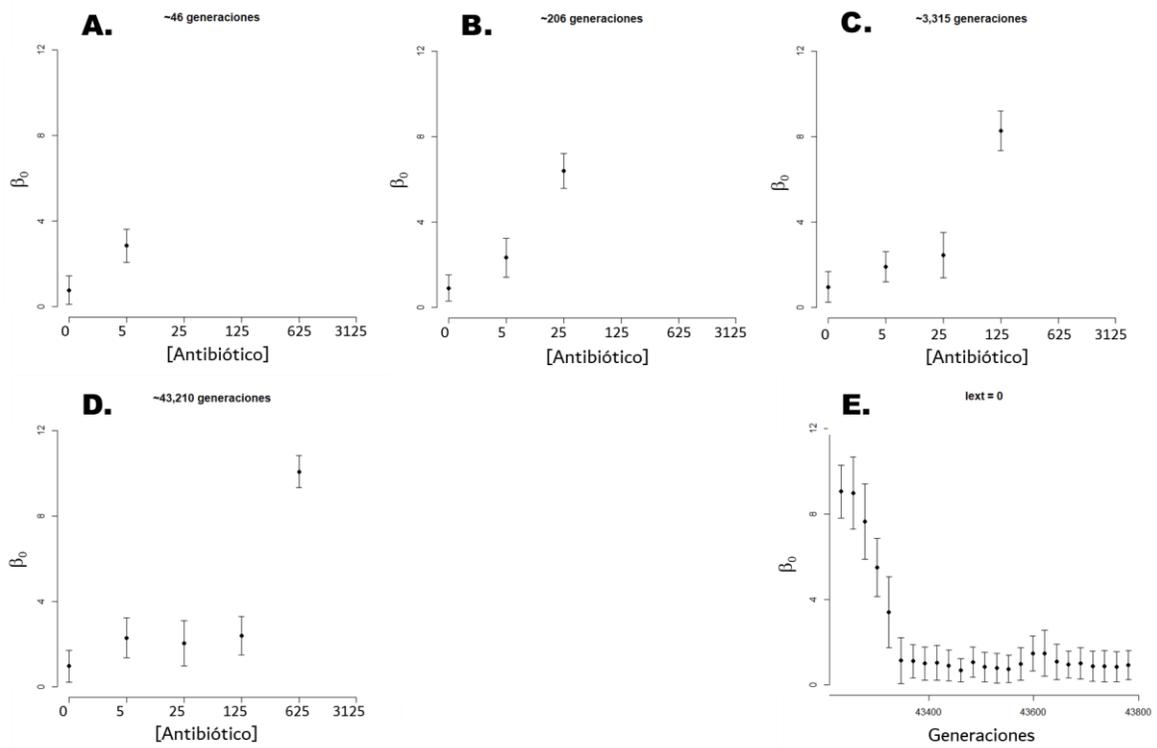


Figura 27. Valores que adquiere β_0 en un gradiente exponencial con una base igual a 5 unidades. Las gráficas A-D, indican el valor promedio de β_0 en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. E) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 625 unidades, en un medio sin antibiótico.

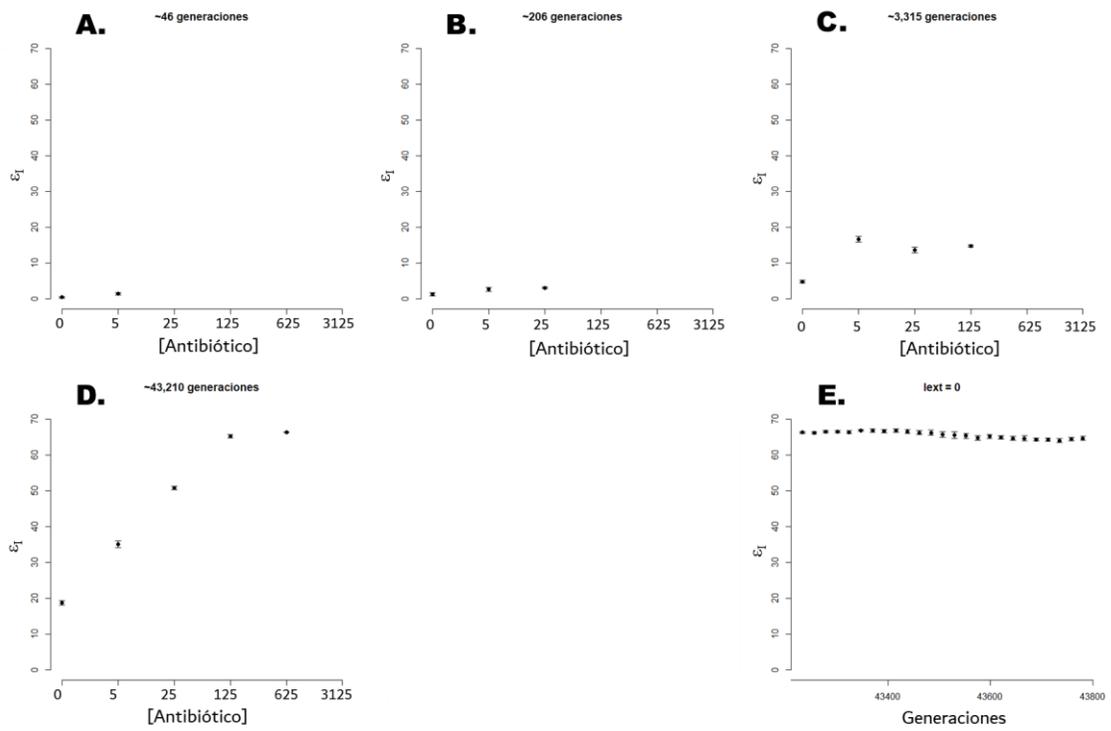


Figura 28. Valores que adquiere EI en un gradiente exponencial con una base igual a 5 unidades. Las gráficas A-D, indican el valor promedio de EI en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. E) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 625 unidades, en un medio sin antibiótico.

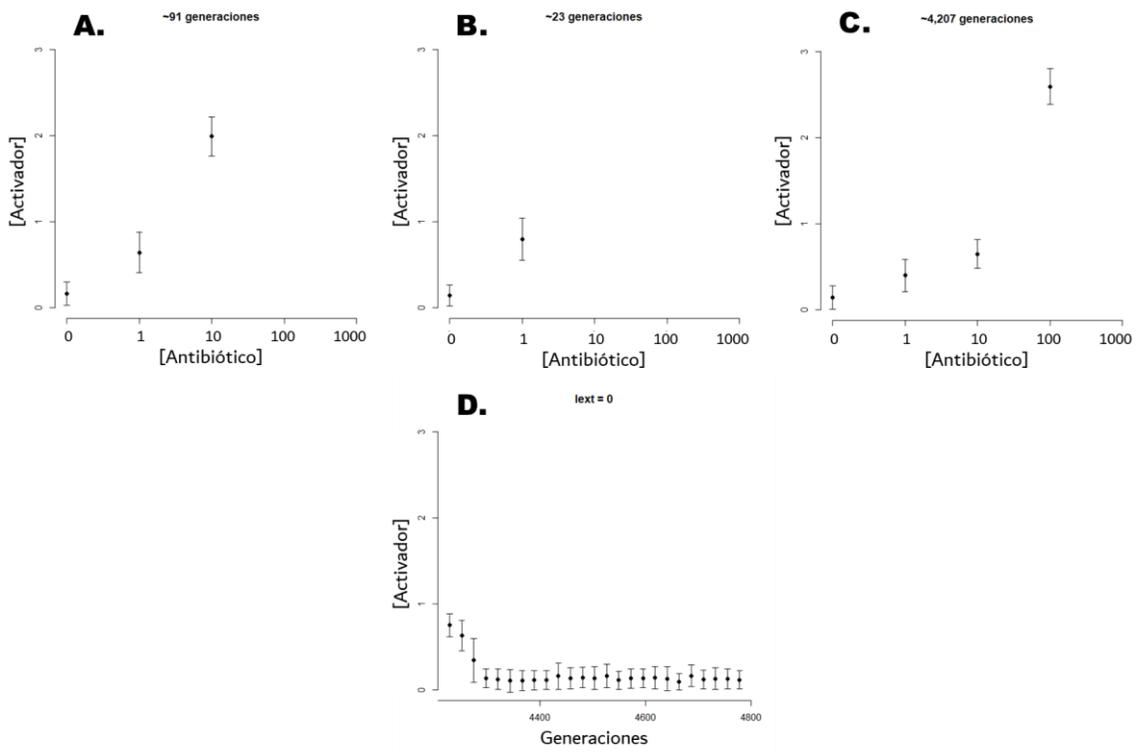


Figura 29. Expresión del activador en un gradiente exponencial con base igual a 10 unidades. Las gráficas A-C, indican la expresión promedio del activador en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. D) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 100 unidades, en un medio sin antibiótico.

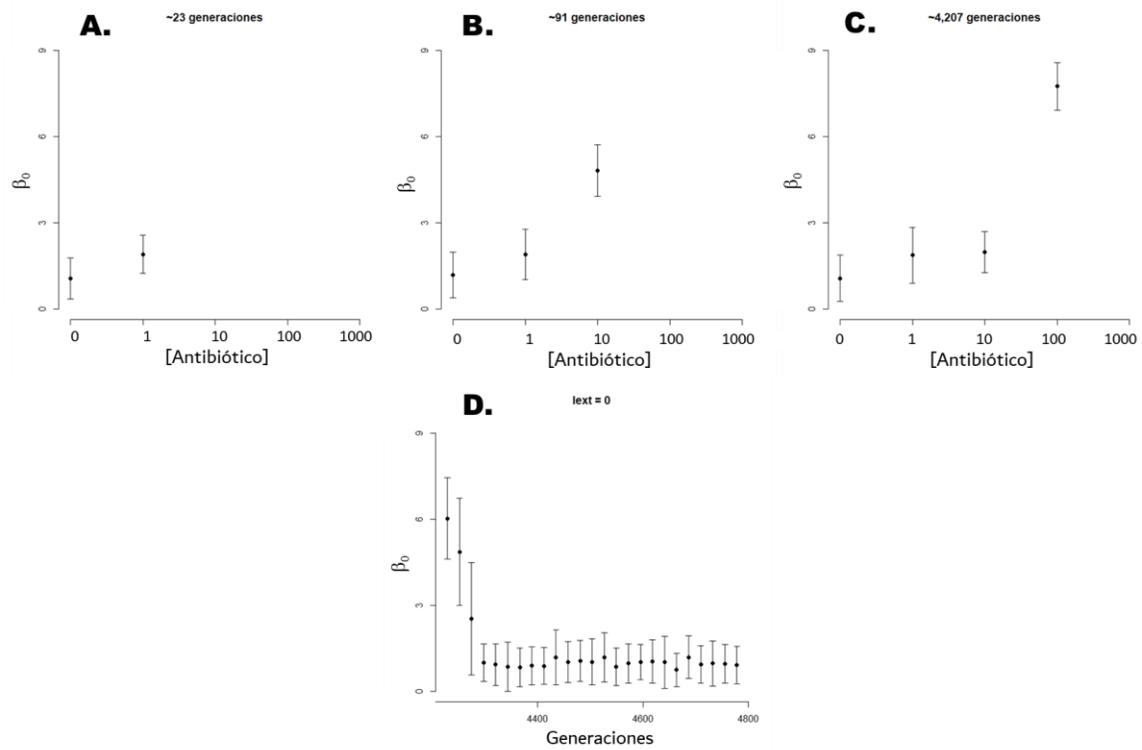


Figura 30. Valores que adquiere β_0 en un gradiente exponencial con una base igual a 10 unidades. Las gráficas A-C, indican el valor promedio de β_0 en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. D) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 100 unidades, en un medio sin antibiótico.

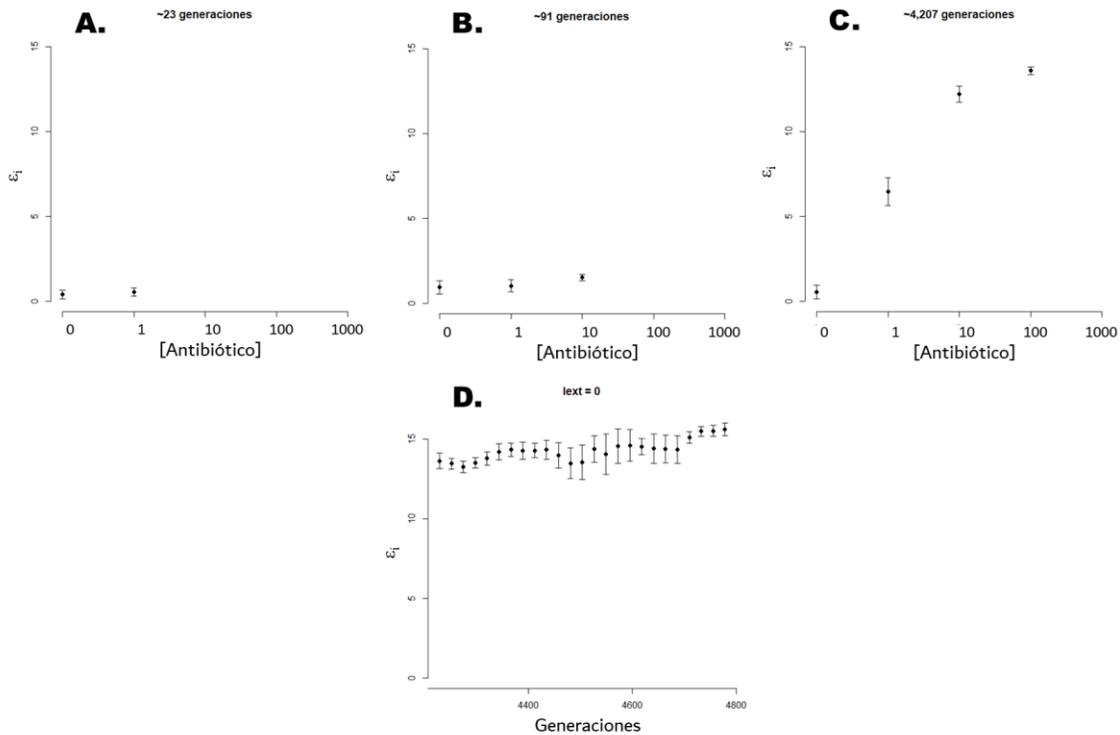


Figura 31. Valores que adquiere ϵ_1 en un gradiente exponencial con una base igual a 10 unidades. Las gráficas A-C, indican el valor promedio de ϵ_1 en una población de 100 células, con su respectiva desviación estándar. El tiempo en que se encontraba ese gradiente está indicado en el título de cada imagen. D) Comportamiento de las bacterias, que ya se habían adaptado a una concentración de antibiótico de 100 unidades, en un medio sin antibiótico.

CONCLUSIONES

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo sugieren que, en un gradiente lineal, es necesario que el parámetro β_0 aumente, es decir, que la expresión de bombas aumente para que la bacteria pueda adaptarse a concentraciones de antibiótico más elevadas. Mientras que, en un gradiente exponencial, lo que permite a las bacterias colonizar nichos con concentraciones más altas de antibiótico, es la eficiencia de las bombas (ϵ_1), aunque en los primeros momentos β_0 les permite sobrevivir. Es decir, en el gradiente lineal vemos el fenotipo de resistencia adaptativa, porque la resistencia a los antibióticos va aumentando gradualmente (conforme se incrementa la concentración de antibiótico a la que está expuesta la población) a través del incremento del valor de β_0 y una vez que se elimina el antibiótico del medio, el fenotipo de resistencia se revierte pues la tasa de expresión máxima del operón Act-Rep disminuye, el comportamiento de este

gradiente es como el de la exposición a dosis sucesivas de antibiótico descrito por Motta *et al.*, 2015. En el caso del gradiente exponencial, el fenotipo de resistencia a los antibióticos está dado por una mayor eficiencia de las bombas de eflujo, la cual se hereda en este modelo de manera genética, por lo que se fija en la población y el fenotipo de resistencia ya no es reversible, sin embargo, en los primeros tiempos de colonización de un nicho con una concentración de antibiótico mayor, β_0 aumenta, lo que permite que las bacterias sobrevivan y se reproduzcan, lo que permite que en la replicación ocurran mutaciones, algunas de las cuales pueden ser favorables para prosperar en ambientes con antibiótico. Así la AdR es un puente para desarrollar mecanismos lentos y estables que no tengan costo para la célula y le permita sobrevivir y colonizar nichos con concentraciones de antibiótico elevadas.

APÉNDICE A

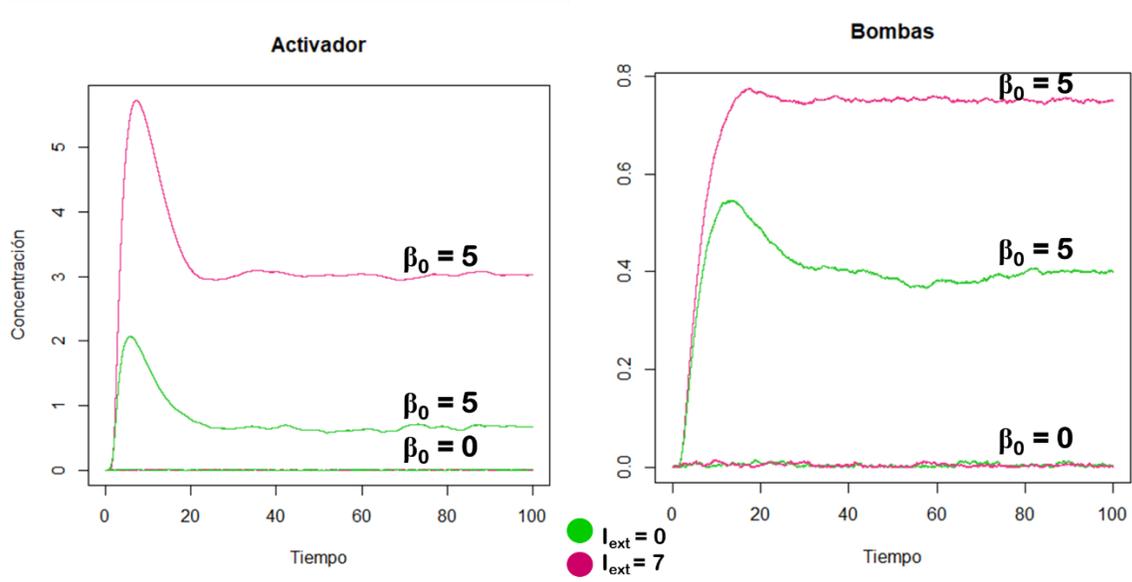


Figura A1. Resultados similares a la figura 7.

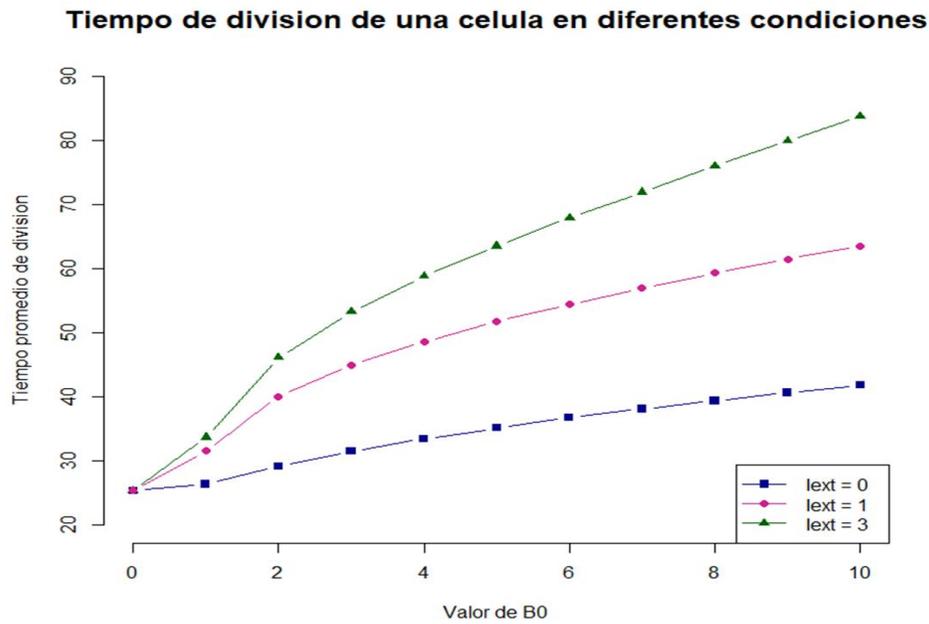


Figura A2. Resultados similares a la figura 8.

Poblacion

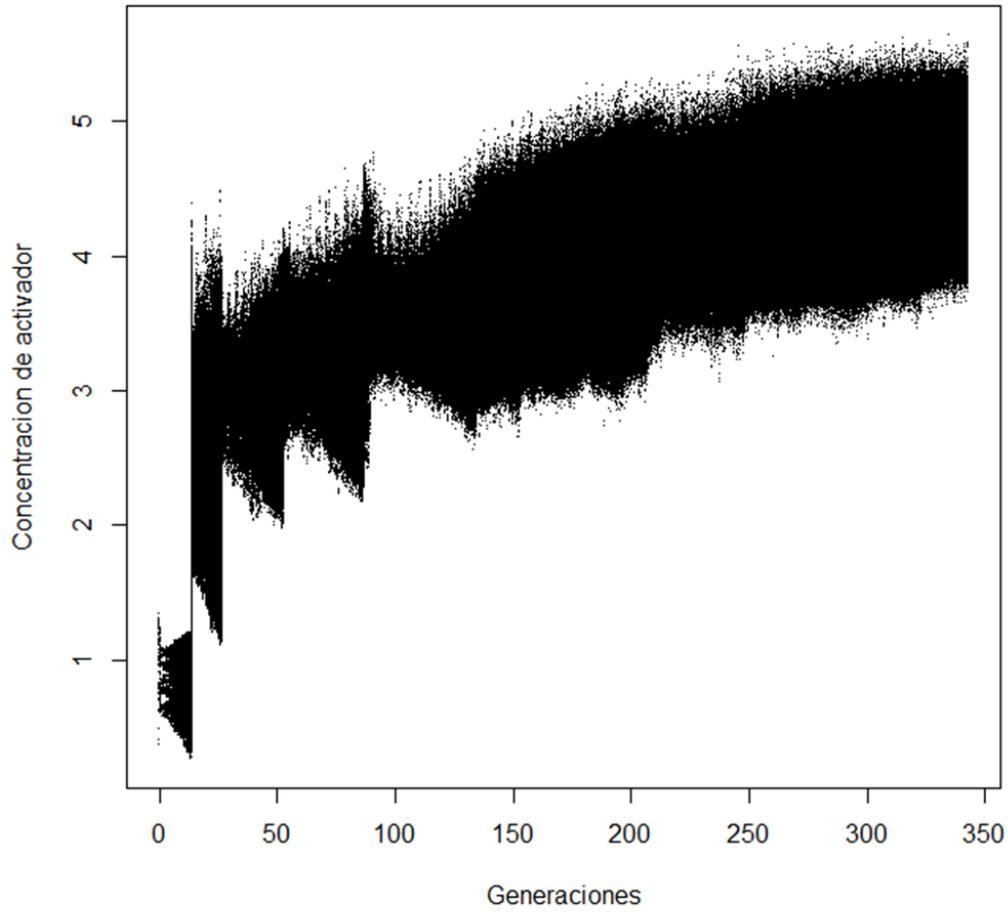


Figura A3. Resultados similares a la figura 10.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adam, M., Murali, B., Glenn, N. O., & Potter, S. S. (2008). Epigenetic inheritance based evolution of antibiotic resistance in bacteria. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 1–12.
2. Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565-1574.
3. Amábile-Cuevas, C. F. (2010). Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *The journal of infection in developing countries*, 4(3):126-131.
4. Amábile-Cuevas, C. F. (2015). *Antibiotics and antibiotic resistance in the environment*. (1ra Ed.) Ciudad de México, Mex: CRC Press/Balkema.
5. Amaral, L., Martins, A., Spengler, G., & Molnar, J. (2014). Efflux pumps of Gram-negative bacteria: What they do, how they do it, with what and how to deal with them. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 1–11.
6. Arzanlou, M., Chai, W. C., & Venter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays In Biochemistry*, 61(1), 49–59.
7. Baym, M., Lieberman, T. D., Kelsic, E. D., Chait, R., Gross, R., Yelin, I., & Kishony, R. (2016). Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science*. 353(6304), 1147-1151.
8. Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M. B. & Martinez, J. L. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, 4, 14, 1-19.
9. Chen, X., & Zhang, J. (2013). No gene-specific optimization of mutation rate in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, 30(7), 1559–1562.
10. Davidson, C. J., & Surette, M. G. (2008). Individuality in Bacteria. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 253–268.
11. Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 417-433.
12. Dirección General de Epidemiología (DGE). Informe 2015 de la Red Hospitalaria para la Vigilancia Hospitalaria. Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHoVE). 2016.
13. Dirección General de Evaluación del Desempeño (DGED). Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud. Secretaría de Salud. 2011.
14. Dreser, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K., & Echániz, G. (2008) Uso de antibióticos en México. *Salud Publica de México*, 50 Suppl 4: S480-S487.

15. Duval, V., & Lister, I. M. (2014). MarA, SoxS and Rob of *Escherichia coli* – Global regulators of multidrug resistance, virulence and stress response. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 2(3), 101–124.
16. Dwyer, D. J., Collins, J. J., & Walker, G. C. (2015). Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55(September), 313–332.
17. Elliott, A. M., Berning, S. E., Iseman M. D., Peloquin, C. A. (1995). Failure of drug penetration and acquisition of drug-resistance in chronic tuberculous empyema. *Tuberculosis and Lung Disease* 76:463–467.
18. Fernandes, R., Amador, P., & Prudêncio, C. (2013). β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*. 24, 7-17.
19. Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 661–681.
20. Gaynor, M., & Mankin, A. S. (2010). Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. *Frontiers in Medicinal Chemistry - (Volume 2)*, 21–35.
21. Griffith, K. L., Fitzpatrick, M. M., Keen, E.F., & Wolf, R. E. (2009). Two functions of the C-terminal domain of *Escherichia coli* Rob: mediating "sequestration-dispersal" as a novel off-on switch for regulating Rob's activity as a transcription activator and preventing degradation of Rob by Lon protease. *Journal of Molecular Biology*; 388:415–430.
22. Henderson, I. R., & Owen, P. (1999). The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving dam and OxyR. *Journal of Bacteriology*, 181(7), 2132–2141.
23. Hermsen, R., Deris, J. B., & Hwa, T. (2012). On the rapidity of antibiotic resistance evolution facilitated by a concentration gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27), 10775–10780.
24. Jiménez-Arribas, G., Léautaud, V., & Amábile-Cuevas, C. F. (2001) Regulatory locus soxRS partially protects *Escherichia coli* against ozone. *FEMS Microbiol Letters* 195: 175-177.
25. Jones, R. N., Fritsche, T. R., & Moet, G. J. (2008) In vitro potency evaluations of various piperacillin/tazobactam generic products compared with the contemporary brand (Zosyn, Wyeth) formulation. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 61: 76-79.
26. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423-435.
27. Kurenbach, B., Marjoshi, D., Amábile Cuevas, C. F., Ferguson, G. C., Godsoe, W., Gibson, P. & Heinemann, J. A. (2015) Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides dicamba, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and

- glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *mBio*, 6, 1-9.
28. Laxminarayan, R., Van-Boeckel, T. & Teillant, A. (2015) The economic costs of withdrawing antimicrobial growth promoters from the livestock sector. *OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers*, 78.
 29. Levin, B. R., Perrot, V., & Walker, N. (2000). Compensatory Mutations, Antibiotic Resistance and the Population Genetics of Adaptive Evolution in Bacteria. *Genetics*, 154, 985–997.
 30. Levy, S. B., & Bonnie, M. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(12S), S122–S129.
 31. Li, X. Z., & Nikaido, H. (2004). Efflux-Mediated Drug Resistance. *Drugs*, 64(2), 159-204.
 32. Li, X. Z., & Nikaido, H. (2009). Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update. *Drugs*, 69(12), 1555–1623.
 33. Li, X. Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418.
 34. Martin, R. G., Bartlett, E. S., Rosner, J. L., & Wall, M. E. (2009). Activation of the *E. coli* *marA/soxS/rob* regulon in response to transcriptional activator concentration. *Journal of Molecular Biology*, 380(2), 278–284.
 35. Moat, A. G., Foster, J. W., & Spector, M. P. (2002). *Microbial physiology*. (4th Ed.) Nueva York, EUA: Wiley-Liss.
 36. Motta, S. S., Cluzel, P., & Aldana, M. (2015). Adaptive resistance in bacteria requires epigenetic inheritance, genetic noise, and cost of efflux pumps. *PLoS ONE*, 10(3), 1–18.
 37. Nikaido, H., & Pagès, J. M. (2012). Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 340–363.
 38. Nunoshiba, T., deRojas-Walker, T., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. & Demple, B. (1993). Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 9993–9997.
 39. Plesiat, P., Llanes-Barakat, C., El’Garch, F., Jeannot, K., & Hocquet, D. (2006). Cumulative Effects of Several Nonenzymatic Mechanisms on the Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(3), 1016–1021.
 40. Rando, O. J., & Verstrepen, K. J. (2007). Timescales of Genetic and Epigenetic Inheritance. *Cell*, 128(4), 655–668.
 41. Rosner, J.L. 1985. Nonheritable resistance to chloramphenicol and other antibiotics induced by salicylates and other chemotactic repellants in *Escherichia coli* K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82: 8771-8774.

42. Sanchez-Romero, M. A., & Casadesus, J. (2014). Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 355–360.
43. Sandoval-Motta, S., & Aldana, M. (2016). Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: A systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 8(3), 253–267.
44. Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K. & Grossart, H. P. (2013) The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*, 4, 47, 1-13.
45. Smith, A.D., Datta, S.P., Smith, G.H., Campbell, P.N., Bentley, R., and McKenzie, H.A. (2000). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology Revised Edn* (Oxford University Press, Oxford, UK).
46. Snyder, L., Peters, J. E., Henkin, T. M., & Champness W. (2013). *Molecular genetics of bacteria*. (4th Ed.) Washington DC, EUA: ASM Press.
47. Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(2), 254–267.
48. Tenson, T., & Mankin, A. S. (2001). Short peptides conferring resistance to macrolide antibiotics. *Peptides*, 22(10), 1661–1668.