



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD PLASMIDICA EN *Salmonella typhi*,
POSTERIOR AL ESTADO DE PERSISTENCIA INDUCIDO POR
EXPOSICIÓN AL PARATIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

BRENDA XANAT DE LUNA VILLASANA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

De Luna
Villasana
Brenda
Xanat
5525027770
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología

2. Datos del tutor

Dr.
Rafael
Camacho
Carranza

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Patricia
Ramos
Morales

4. Datos del sinodal 2

Dra.
María Eugenia
Gonsebatt
Bonaparte

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Arturo
Carlos II
Becerra
Bracho

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Javier
Andrés
Juárez
Díaz

7. Datos del trabajo escrito

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD PLASMIDICA EN *Salmonella typhi*, POSTERIOR AL ESTADO
DE PERSISTENCIA INDUCIDO POR EXPOSICIÓN AL PARATIÓN

45p.

2024

Agradecimientos institucionales

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por permitirme finalizar una licenciatura en sus instalaciones. Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM (PAPIIT), ya que el presente trabajo de Tesis fue parcialmente financiado por DGAPA-PAPIIT [IN204021]. Se hace un reconocimiento explícito por su apoyo técnico experimental a Biol. Sandra Luz Hernández Ojeda, y a la M.C. Xanthia Olinska Rivera Ramírez por su apoyo en el diseño experimental. Al Dr. Rafael Camacho Carranza por dirigir este trabajo con su amplio conocimiento y experiencia. Al laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, UNAM. A la Dra. Patricia Ramos Morales, a la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, al Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho y al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz por formar parte de mi jurado y contribuir con sus valiosas aportaciones a esta tesis.

Agradecimientos personales

Agradezco a Dios, a ustedes, a mis padres, mis hermanos, mis abuelos y mi familia por impulsarme siempre y no dejarme sola en este camino. A mi madre por darme todo lo que tengo, permitirme formarme y culminar este proceso. A Daniel por motivarme y regalarme la tranquilidad para poder seguir avanzando. A Hércules por ser mi compañero de desvelos y estar siempre ahí. A Xan y Sam porque gracias a ustedes este trabajo se formó, son unos grandes maestros. A mis compañeros de laboratorio, cada uno de los que aportaron a este trabajo. A mis maestros de la carrera que contribuyeron en mi formación académica y a todas las personas que formaron parte y apoyaron la tesis.

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción	3
1.1 Los plásmidos.....	3
1.2 Plásmidos conjugativos	4
1.3 Factores para mantener la estabilidad plasmídica	5
1.4 Sistema toxina-antitoxina para mantener plásmidos	6
1.5 Genes implicados en el mantenimiento del plásmido	7
1.6 Estabilidad plasmídica en patógenos de importancia clínica	8
1.7 Estrés da como resultado mutaciones	9
1.8 Inductores de estrés en la bacteria y su repercusión en plásmidos	10
1.9 Persistencia.....	11
II. Planteamiento del problema	12
III. Hipótesis.....	13
IV. Objetivos	13
V. Material y métodos.....	14
5.1 Cepas, pesticida y plásmido utilizados en este trabajo.....	14
5.2 Cálculo de la concentración mínima inhibitoria	15
5.3 Estandarización de la bacteria	15
5.4 Inducción de estrés y caracterización fenotípica.....	17
5.5 Contra selección a la resistencia a tetraciclina.....	19
5.6 Análisis de datos.....	19
VI. Resultados	20
6.1 Concentración mínima inhibitoria de <i>S. typhi</i>	20
6.2 Crecimiento comparativo en presencia de antibiótico	21
6.3 Ensayo de tasa de supervivencia por medio de inducción a estrés por exposición al metil paratión	22
6.4 Estabilidad fenotípica del plásmido	23
6.5 Contra selección a resistencia a la tetraciclina.....	24
VII. Discusión.....	25
7.1 La MIC para <i>S. typhi</i> vs <i>S. enterica</i>	25
7.2 Las bacterias con medio selectivo mostraron un crecimiento más lento	25
7.3 Supervivencia bacteriana posterior a la inducción a estrés por metil paratión	26
7.4 Persistencia por pesticida en cepa de importancia clínica.....	28

7.5	Estabilidad plasmídica.....	29
I.	El estrés genera la activación de los sistemas de protección que a su vez favorecen la transferencia conjugativa	29
II.	El número de copias del plásmido más interacción con el entorno abiótico impacta en la estabilidad plasmídica	30
III.	Influencia de la adaptación plásmido-hospedero.....	31
7.6	<i>Hok/sok</i> involucrado en la competencia entre plásmidos.....	34
7.7	Caracterización fenotípica	35
7.8	Importancia de la estabilidad plasmídica en la salud pública.....	37
7.9	Contra selección a tetraciclina resistente	38
VIII.	Conclusiones	39
IX.	Perspectivas.....	40
	Referencias.....	41
	Anexos.....	47

Resumen

Salmonella typhi es una bacteria de importancia médica debido a que presenta resistencia a varios antibióticos; sin embargo, se define como un hospedero pobre de plásmidos. Por otro lado, tenemos a pHN32, un plásmido inestable que se desensambla en el hospedero. Se sabe que el estrés juega un papel muy importante en las comunidades bacterianas, ya que puede dar lugar al estado de persistencia (estado metabólico latente) o activar mecanismos de protección celular que a su vez genera mutaciones o rearrreglos que comprometen la estabilidad plasmídica. Entre los inductores de estrés menos documentados se encuentran los pesticidas de los cuales se sabe, son capaces de inducir la selección de colonias persistentes. Con base en lo anterior, como hipótesis se propone que, ante el estado de persistencia inducido en *S. typhi* por metil paratión, el plásmido pHN32 contenido en la bacteria, sufrirá modificaciones (rearrreglos) reflejadas en variaciones fenotípicas, dando lugar a una pérdida en la estabilidad de éste.

Metodología: Se expuso a la cepa que contiene el plásmido con resistencia a tetraciclina y estreptomina, a diversas concentraciones de metil paratión, en un intervalo y bajo condiciones específicas. Posteriormente se realizó un conteo para determinar la supervivencia, y un test de variaciones fenotípicas plasmídicas para indicar el estado de la estabilidad plasmídica. Finalmente, por medio de un ensayo en medio Bochner, se corroboraron los resultados con las células portadoras del plásmido.

Resultados: La concentración mínima inhibitoria de *S. typhi* respecto al metil paratión es de 0.6127 mg/ml. Las bacterias que crecieron en medio sin selector, alcanzaron una $D.O_{600} = 0.4$ a las 4h de incubación. La supervivencia bacteriana para 1x de la MIC equivale al 3% como valor más alto y 0.000073% para 3x como valor más bajo. Se observó que de 200 parches en medios NB, NBTc, NBSm y NB con ambos selectores solamente uno de ellos se perdió. Finalmente se realizó una contra selección en medio Bochner encontrando la presencia de células TcR para la cepa estudiada.

Conclusiones: La concentración mínima inhibitoria es diferente en *Salmonella typhimurium* y *S. typhi*. Las bacterias que se encuentran en medio selectivo tuvieron un crecimiento más lento con relación al crecimiento en medio sin selector. El porcentaje de supervivencia de las células es inversamente proporcional, respecto a la concentración del pesticida. Contrario a lo esperado, encontramos que posterior a la exposición al pesticida y al salir de un estado de persistencia, el plásmido se conserva

estable. En un medio de cultivo se aisló un mutante resistente a Tc y Sm, pero sensible a la acción conjunta de ambos antibióticos; esto debido posiblemente a un conflicto de manejo energético que implicarían ambos antibióticos.

1. Introducción

1.1 Los plásmidos

Las bacterias son organismos procariontes, que existen desde hace millones de años. Pueden vivir en condiciones extremas y proliferar ante agentes estresantes, en parte debido a la integración de elementos genéticos extra cromosomales, como los plásmidos. La mayoría de los plásmidos son, moléculas circulares de DNA de doble hebra. Se encuentran como copias únicas o múltiples, las cuales solo logran replicarse dentro de la célula hospedera (Fig. 1) [1,2].

Durante el descubrimiento de los plásmidos en 1957, se observó que existe una relación directa entre su presencia en la célula y la resistencia a los antibióticos. Esto sugiere que la mayoría de los plásmidos benefician a las bacterias, confiriéndoles resistencia a uno o más antibióticos. Adicionalmente, está documentado que los plásmidos también presentan genes de resistencia a metales pesados e incluso a productos químicos industriales, tales como pesticidas, herbicidas o derivados del petróleo. Además de proporcionar factores de virulencia o colonización, que necesitan las bacterias infecciosas para invadir a su hospedero. Sin embargo, la introducción del plásmido a la bacteria tiene un costo metabólico y por ende, puede provocar conflictos en el correcto funcionamiento celular [1].

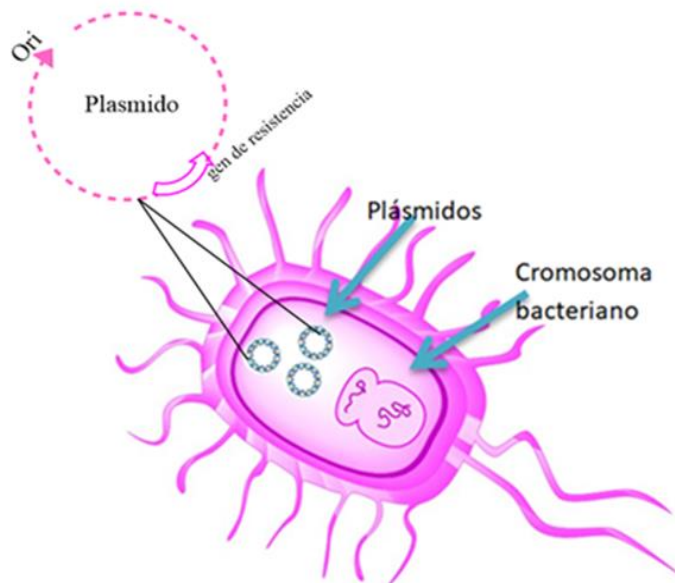


Figura. 1. Esquema representativo de una bacteria conteniendo plásmidos. El plásmido es material genético extracromosomal, formado por DNA circular de doble hebra con múltiples copias. Dentro del material genético del plásmido se encuentran genes de resistencia, que pueden conferirles beneficios a las bacterias, incluyendo la capacidad de crecer ante antibióticos, metales pesados y productos químicos.

1.2 Plásmidos conjugativos

Una manera de clasificar a los plásmidos es por la capacidad que presentan de transferirse de una célula a otra. Los plásmidos conjugativos son aquellos que codifican los elementos necesarios para la transferencia de material genético entre células: 1) una secuencia que codifica el origen de la transferencia (OriT); 2) una maquinaria de procesamiento de DNA, que incluye la relaxasa que corta y se une al OriT; y 3) un sistema de secreción de tipo IV (T4SS). A través de dichos elementos se transfiere DNA y una proteína de acoplamiento; siendo la conexión entre los componentes intracelulares, con el sistema de secreción como lo son los genes de movilidad (MOB), así como el pilus, encargado de poner en contacto a la célula donadora con la receptora (Fig. 2) [3,4].

Durante la conjugación el plásmido ingresa a la nueva célula como DNA monocatenario, produciendo una activación transitoria de la respuesta SOS. Esto es resultado de un mecanismo de protección ante el estrés para reparar DNA dañado, aumentando las tasas de mutación y recombinación. La activación del grupo de genes SOS también da como resultado la inhibición de la división celular. Dicha respuesta puede durar varias generaciones, dando lugar a mutaciones cromosómicas compensatorias, mismas que promueven la adaptación del hospedero a su plásmido, disminuyendo el costo metabólico del mismo [5,6].

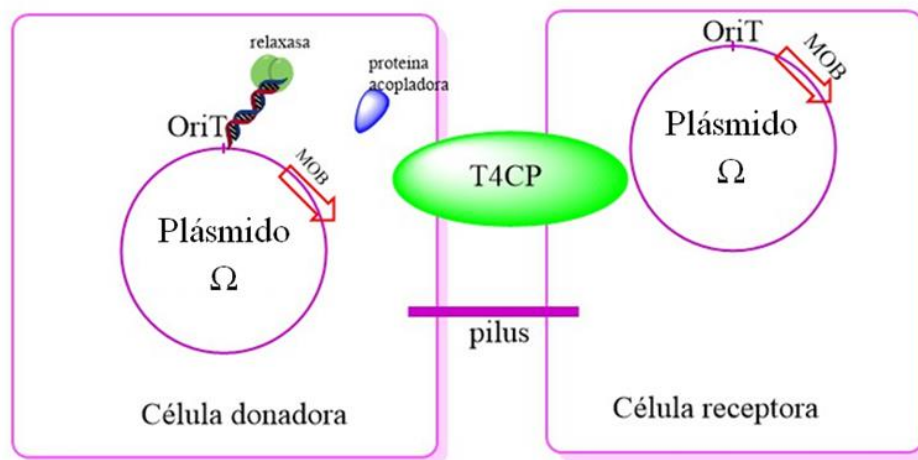


Figura 2. Esquema de principales elementos de la conjugación plasmídica. Se muestran dos células donadora (izquierda) y receptora (derecha), mediadas por el pilus. También se muestra, el sitio OriT el cual codifica el origen de la transferencia. Genes MOB, los cuales se encargan de la movilización. Relaxasa, proteína que reconoce y corta el sitio OriT para “relajar” el súperenrollamiento. Sistema de secreción, el cual, entra en contacto con la relaxasa, por la proteína acopladora (T4CP).

1.3 Factores para mantener la estabilidad plasmídica

La estabilidad plasmídica se define como el mantenimiento del plásmido en la población celular, conservando y heredando sus características fenotípicas. Por lo tanto se dice que un plásmido es inestable si en una población donde están presentes, los miembros de ésta los van perdiendo. Se ha demostrado que la estabilidad del plásmido está influenciada por diversos factores, siendo la replicación y la segregación esenciales para la misma. Uno de los procesos de replicación más frecuente, es la llamada replicación en círculo rodante. En ésta, a partir del sitio *ORI* se corta una hebra del DNA de doble hebra, obteniendo dos regiones de una sola hebra. El DNA se sintetiza comenzando por el final de la hebra rota, mientras que la otra hebra circular se utiliza como plantilla y se rellena el espacio dejado por el corte de la hebra inicial [1].

Otro factor importante para la estabilidad plasmídica es el número de copias de plásmidos en la célula. Esto tiene implicaciones para el nivel de expresión génica y el costo energético del mismo para la célula hospedera. Durante la replicación plasmídica, se pueden producir multímeros, que son genomas de plásmidos fusionados. Esto se debe a defectos en la terminación de la replicación o por recombinación homóloga. Los plásmidos multiméricos implican una reducción del número de copias, por lo tanto, es una de las principales causas de inestabilidad. En consecuencia, muchos plásmidos contienen un sistema activo de resolución de multímeros (MRS, por sus siglas en inglés) que facilita la conversión de multímeros en monómeros. Para que los plásmidos se puedan heredar es necesario segregarse copias de estos durante la división celular. La segregación de plásmidos con pocas copias normalmente se basa en sistemas de partición activa (ParAB), el cual se encarga de distribuir las copias en las células hijas (Fig. 3). Otros factores que influyen en la segregación son: 1) la adaptación plásmido-hospedero; 2) condiciones ambientales, como la temperatura; y 3) nutrientes en el medio o condiciones selectivas [1,7,9].

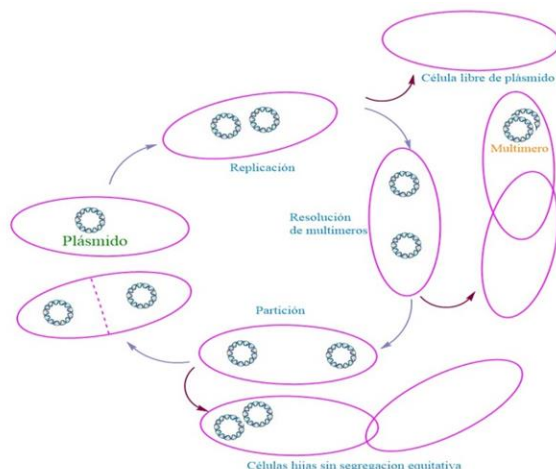


Figura 3. La replicación es crucial para la presencia del plásmido en la célula. Una falla en la replicación conduce a la pérdida del plásmido. La replicación, puede ir acompañada de la formación de multímeros. Al no realizar la resolución de los mismos, puede conducir a la pérdida de plásmidos. La segregación de plásmidos en células hijas durante la división celular puede verse facilitada por mecanismos de partición. La falla en la segregación equitativa puede conducir a la pérdida de plásmidos (Modificado de Wejn, T., & Dagan, T. 2020)

1.4 Sistema toxina-antitoxina para mantener plásmidos

El sistema toxina-antitoxina (T-A, por sus siglas en inglés) es un mecanismo que llevan a cabo los plásmidos para asegurar que la célula hospedera no los pierda. Consta de dos elementos importantes: una toxina, la cual es letal para la célula, y un antídoto o antitoxina. La antitoxina generalmente se compone de un dominio N-terminal que contiene sitios de dimerización y unión al DNA, además de un dominio C-terminal esencial para la unión y neutralización de la toxina. El dominio de unión al DNA de la antitoxina, se une a la región promotora de su propio operón y reprime su transcripción, asegurando la presencia del plásmido (Fig. 4). Las toxinas que pertenecen a los sistemas típicos del sistema T-A funcionan como RNasas que interfieren con la traducción del RNA. Así como con la replicación del DNA al interferir con la DNA girasa y la topoisomerasa IV, además de degradar el NAD⁺ e interferir con el crecimiento bacteriano. Estudios recientes han demostrado que los sistemas T-A pueden mejorar la estabilidad plasmídica. Por otra parte, se ha observado, que muchos plásmidos presentan dos o más sistemas diferentes para disminuir las posibilidades de que la célula sobreviva después de perderlos. Esto podría relacionarse, ya que la expresión de algunos de sus genes además de neutralizar su propia toxina en el sistema T-A, podrían influir en el correcto funcionamiento de la maquinaria celular, aportándole un beneficio a la célula [1,10].

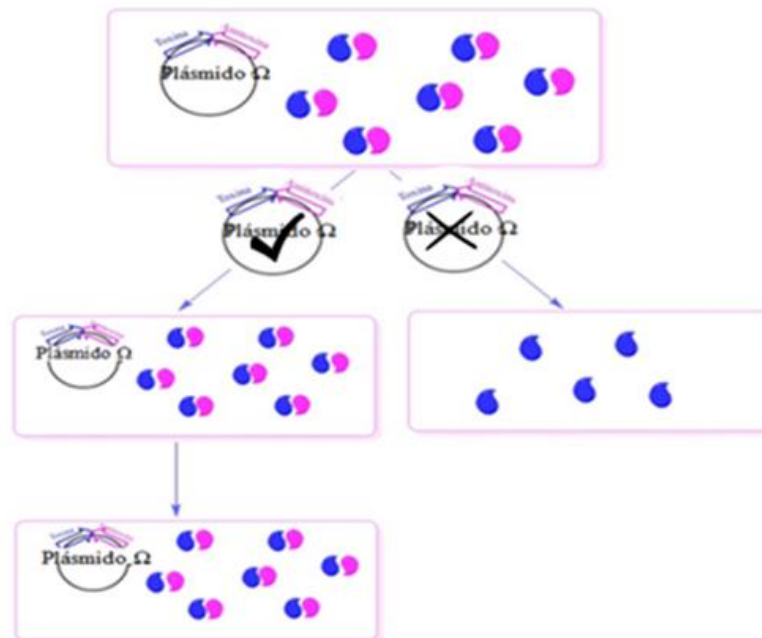


Figura 4. Ilustración del sistema T-A. Si la toxina y la antitoxina están presentes en la célula, se puede asegurar la supervivencia de la misma y el mantenimiento del plásmido. Ya que la toxina es más estable que la antitoxina, al perderse esta última la bacteria detendrá su crecimiento y morirá.

1.5 Genes implicados en el mantenimiento del plásmido

Existen dos genes esenciales para mantener al plásmido estable en la célula hospedera, los genes *Partición (PAR)*. *ParA* codifica una ATPasa que proporciona la energía requerida para el movimiento intracelular y la segregación de los plásmidos, mientras que *ParB* codifica una proteína de unión a DNA que ensambla los plásmidos para dirigir su segregación en las células hijas.

Se sugiere que las regiones PAR interactúan con proteínas de la membrana externa bacteriana, permitiendo que durante su división, los plásmidos se distribuyan equitativamente en las células hijas (Fig. 5). Los sitios PAR se consideran análogos a los centrómeros, ya que también son los sitios de ensamblaje de la maquinaria de segregación [11,7].

Otros genes implicados en la estabilidad plasmídica son *Hok/Sok*, los cuales forman parte de un sistema de muerte post-segregacional. Estos se basan en la inhibición postranscripcional de la síntesis de proteínas de toxinas, por parte del RNA antisentido. *Hok* codifica una proteína transmembranal tóxica, la cual provoca un rápido colapso del potencial de membrana y detiene la respiración de la célula. La expresión de *Hok* está regulada postranscripcionalmente por el RNA antisentido *Sok*, mismo que es complementario a la secuencia inicial o región líder del mRNA de *Hok* [12].

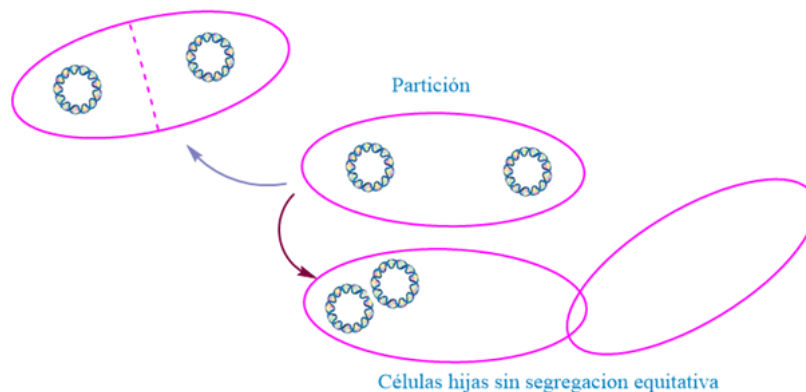


Figura 5. Los genes PAR, son los encargados de llevar a cabo el proceso de partición en la célula huésped. Al codificar una ATPasa para permitir el movimiento y segregación equitativa de los plásmidos. Permitiendo que durante su división todas las células hijas los mantengan.

1.6 Estabilidad plasmídica en patógenos de importancia clínica

El género *Salmonella* pertenece al grupo de bacterias gram-negativas causantes de diversas infecciones, por lo que es considerado como patógeno prioritario, debido a las variaciones genéticas que surgen durante la infección del hospedero; así como nuevos genes adquiridos a través de la transferencia horizontal (Fig. 6). Esto ha permitido a *Salmonella* evolucionar su mecanismo de patogénesis para adaptarse a múltiples especies de vertebrados. Entre las adaptaciones evolutivas, se han encontrado serotipos específicos de un hospedero como *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*), agente causal de la fiebre tifoidea. Dicha enfermedad afecta predominantemente a niños en edad escolar, especialmente en los países en vías de desarrollo. *S. typhi* ingresa al hospedero vía oral, invadiendo y destruyendo células del tejido linfoide de la mucosa intestinal, diseminándose a todos los órganos vía sanguínea. Aunque la fiebre tifoidea se puede tratar eficazmente con antibióticos, existe preocupación por el elevado número de cepas resistentes a los antibióticos que se han aislado [13,14,15].

Hasta 1972 no se había documentado la presencia de resistencia a antibióticos en cepas de *S. typhi*. Sin embargo, tras una epidemia de fiebre tifoidea en 2004 se encontraron cepas resistentes a múltiples antibióticos, a pesar de que la bacteria no porta genes de resistencia, es posible que la presencia de plásmidos sea la causa de esta capacidad [16]. En un estudio al analizar diversos plásmidos, se encontró que la bacteria los perdía fácilmente describiéndola como un hospedero pobre. A excepción de pHN32, un plásmido conjugativo resistente a tetraciclina y estreptomina (Tc^R , Sm^R) el cual, a pesar de perder resistencias al entrar a la bacteria, se segregó con un proceso cinético muy lento, abriendo una incógnita sobre la estabilidad del plásmido en la bacteria. Tomando en cuenta que la diseminación mundial de plásmidos que codifican resistencia a los antibióticos representa un problema urgente para la salud humana y la sociedad.

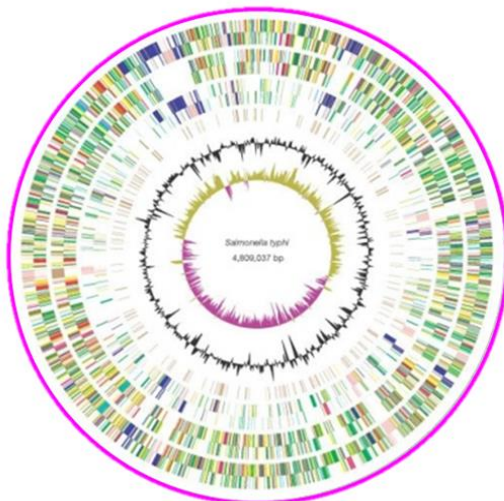


Figura 6. Representación del genoma de *S. typhi*. Los genes están codificados por colores según su función: azul oscuro, patogenicidad/adaptación; negro, metabolismo energético; rojo, transferencia de información; verde oscuro, membranas/estructuras superficiales; cian, degradación de macromoléculas; púrpura, degradación de moléculas pequeñas; amarillo, metabolismo central/intermedio; azul claro, reguladores; rosa, fago/elementos IS; naranja, conservado hipotético; verde pálido, función desconocida; marrón, pseudogenes (Tomado de Parkhill *et al.*, 2001).

1.7 Estrés da como resultado mutaciones

El estrés implica la exposición de las bacterias a un cambio ambiental que para compensar la nueva situación requiere de una respuesta, incluso transcripcional; El cambio en el ambiente puede incluir la presencia de agentes tóxicos en dosis subletales que producen un estado de incompatibilidad con las funciones biológicas regulares. La exposición a bajas concentraciones de agentes tóxicos, tiene un efecto estimulante para la transcripción de genes únicos. Por otro lado, una dosis elevada puede provocar la activación de regulones completos, que forman parte de los mecanismos globales de respuesta al estrés. Las bacterias pueden llegar a un estado de estrés por diversos motivos, principalmente ambientales como: 1) la presencia de antibióticos u otras soluciones químicas, 2) la composición del medio de cultivo, 3) los cambios de temperatura; y 4) las fluctuaciones de oxígeno, entre otros. Dichos factores pueden elevar la tasa de mutación y promover recombinación entre secuencias, dando lugar a la inestabilidad estructural del plásmido [17].

Como se mencionó anteriormente, ante un factor estresante que dañe al DNA, la célula da lugar a la respuesta SOS, la cual contiene el daño. Dicha respuesta es mediada por proteínas como RecA y LexA; en ausencia de estrés, LexA actúa como un represor de los genes de respuesta al daño. En contraste, como resultado de la inducción de estrés a la célula, se genera DNA monocatenario (ssDNA). RecA detecta la acumulación de ssDNA y se polimeriza para formar un filamento de nucleoproteína helicoidal, mismo que transduce la señal de estrés al regulador LexA, provocando una actividad latente de serina proteasa dentro de LexA que conduce a su autoescisión y degradación. La escisión de LexA provoca la activación del gen reprimido *Pol-V*, mismo que se replica, dando como resultado mutaciones (Fig. 7). Los promotores de la respuesta SOS también participan en la aceleración de intercambio genético, además de promover vías de tolerancia como la formación de biopelículas [18,19].

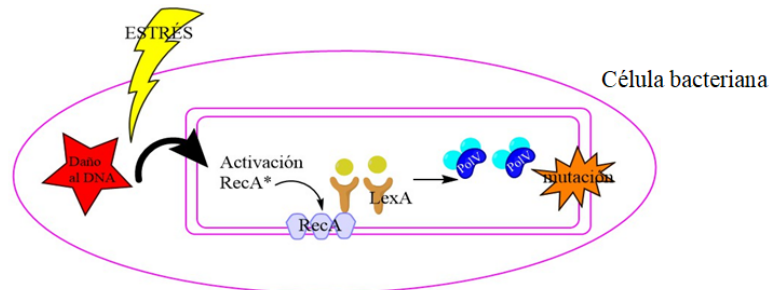


Figura 7. Esquema de la respuesta SOS. Se produce estrés en la célula, dando lugar a daño al DNA. Activando a RecA tras la acumulación de DNA monocatenario (ssDNA). Estos filamentos de DNA monocatenario RecA* facilitan la reparación de roturas de cadena, o reinician complejos de replicación estancados. Sin embargo, los filamentos también inducen la autoescisión de la proteína represora transcripcional SOS, LexA. La escisión de LexA provoca la activación de la expresión de la DNA Polimerasa V (PolV). Misma que se replica, dando como resultado mutaciones (Imagen modificada de Cirz & Romesberg 2007).

1.8 Inductores de estrés en la bacteria y su repercusión en plásmidos

Por su propia naturaleza química, los antibióticos proporcionan una fuente de estrés para las bacterias. Por lo tanto, muchos antibióticos inducen mutagénesis. En varios estudios se demuestra una relación entre la resistencia a los antibióticos y el uso de biocidas (agentes químicos destinados a contrarrestar y controlar el desarrollo de cualquier organismo considerado nocivo para el ser humano). Los biocidas, incluyendo pesticidas, son productos químicos muy comunes no regulados, que se encuentran en constante contacto con bacterias y a su vez con plásmidos. Se ha documentado que los pesticidas promueven la transferencia horizontal de plásmidos resistentes a múltiples fármacos. Lo anterior se debe a que el estrés químico aumenta la permeabilidad de la membrana celular, promoviendo la conjugación de plásmidos, además de la respuesta SOS que puede provocar daños oxidativos en el DNA, en los componentes celulares y en las membranas celulares; por lo tanto, se incrementa la frecuencia de conjugación [20,21,22].

El pesticida metil paratión (Fig. 8) es un sólido cristalino blanco, el cual es disuelto en una solución de xileno para su comercialización. Es tóxico por inhalación, ingestión y absorción cutánea. Se utiliza como insecticida, es del grupo químico de los organofosforados y se encuentra en la categoría toxicológica Clase I, es decir extremadamente tóxico. Su mecanismo de acción es la inhibición de la acetilcolinesterasa. Respecto a los antibióticos, se encuentra la tetraciclina (Tc) la cual actúa inhibiendo la biosíntesis proteica a nivel de los ribosomas 70 y 80s, inhibiendo así la traducción al obstaculizar el ingreso del mRNA al interior de la subunidad 30s del ribosoma. La Tc ingresa al interior de la célula por difusión pasiva y transporte activo. El mecanismo de resistencia bacteriana involucra las bombas de expulsión y pérdida de la permeabilidad celular. Por otra parte la estreptomicina (Sm) ejerce varios efectos sobre las bacterias, ya que además de que inhibe la síntesis de proteínas, produce una lectura errónea de la información del mRNA, determinando la incorporación de algunos aminoácidos incorrectos en la cadena peptídica. Los principales mecanismos de resistencia incluyen la alteración del sitio blanco, por mutación de los genes de proteínas ribosomales [23, 24, 25, 26].

Rivera [25] realizó una búsqueda de resistencia cruzada entre antibióticos y plaguicidas, encontrando que el metil paratión (Fig. 8) es uno de los compuestos más tóxicos.

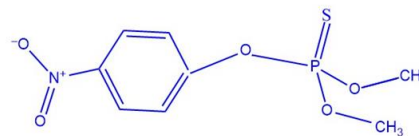


Figura 8. Estructura química de metil paratión (Ácido fosforoditiico, O, O-dimetil O-(4-nitrofenil)éster).

1.9 Persistencia

La persistencia bacteriana se caracteriza por un conjunto de variantes fenotípicas que suceden en una subpoblación pequeña de bacterias, las cuales son llamadas células persistentes. Estas células se forman espontáneamente en respuesta a la exposición a estrés, permitiéndoles sobrevivir. No obstante, sus características no son heredadas a su progenie a diferencia de la resistencia antimicrobiana que sí es heredable y causada por mutaciones genéticas. Otra característica es su estado metabólico latente con funciones carentes o deprimidas, como el bajo nivel de producción de ATP, entre otros. La unión de estas células persistentes más células regulares, da lugar a un biofilm, el cual se define como una comunidad de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos. Los antimicrobianos no pueden erradicarlos, ya que están protegidas por un factor de inmunidad reanudando su crecimiento después de retirar el tratamiento (Figura 10). Entre los mecanismos implicados en la formación de persistentes se encuentran los módulos T-A, que activan la muerte celular programada en respuesta al estrés, daño al DNA y exposición a los antibióticos, además de estar muy sobreexpresados en las células persistentes. El sistema T-A encontrado en *E. coli* posee el gen *HipA*, el primer gen de persistencia descrito *in vitro* el cual detiene la síntesis de DNA y RNA así como proteínas que inhiben el crecimiento celular, dicho gen es neutralizado por *HipB*. La respuesta SOS interviene en la producción de biofilms, además de contribuir a la reparación del DNA pero también induce el desarrollo de módulos T-A. Una de las principales toxinas responsables de la formación de persistentes en respuesta SOS, es la toxina TisB, la cual interrumpe la fuerza motriz protónica, conduciendo a la disminución de los niveles de ATP y, como consecuencia, la inactivación celular (Fig. 9) [27].

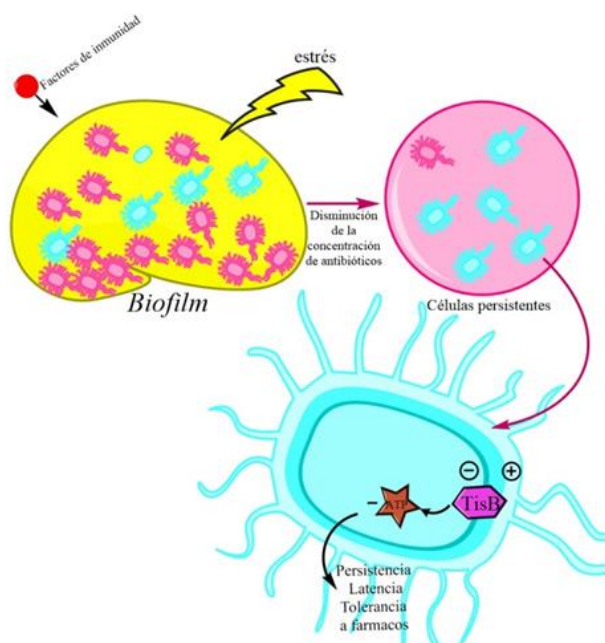


Figura 9. Modelo de tolerancia bacteriana en *biofilm*, donde se encuentra una población formada por células sensibles a los antibióticos (color rosa), las cuales pueden ser erradicadas por el tratamiento con antibiótico, además se encuentran células persistentes (color azul) originadas y/o seleccionadas por el mismo tratamiento, las cuales vuelven a crecer después de la disminución de la concentración del antibiótico. La toxina TisB está presente en el módulo T-A y se expresa en respuesta al daño causado en el DNA por antibióticos, que dañan al DNA, lo que induce la respuesta SOS que regula su reparación y también causa la expresión de la toxina TisB, lo que provoca una disminución en la fuerza motriz protónica y los niveles de ATP, llevando a la célula a un estado persistente y tolerante a los antibióticos (Suclupe-Campos *et al.*, 2020).

II. Planteamiento del problema

S. typhi es una bacteria de importancia médica descrita como un anfitrión asiduo de plásmidos. Sin embargo, debido a la desestabilización de estos, ya que la maquinaria de esta bacteria genera deleciones que implican la pérdida de información genética relevante para la estabilidad plasmídica, *S. typhi* pierde los plásmidos con facilidad. Mendoza, *et. al*, [28] reportaron que *S. typhi* puede recibir plásmidos R de otras enterobacterias, además de acumular estructuras diméricas, recordando, que las formas monoméricas permiten mayor estabilidad del plásmido en el huésped. En los plásmidos estudiados por el grupo de Mendoza, la segregación del marcador de resistencia a antibióticos, dependiente de RecA, antecede a la pérdida del plásmido completo en dicha bacteria.

Sheppard [29] sugiere que los plásmidos son uno de los elementos más peligrosos en el contexto de la salud pública, al portar genes de resistencia a múltiples antibióticos. Adicionalmente, la OMS prevé que para 2050 no existan antibióticos suficientes para combatir a las bacterias multirresistentes. A pesar de estos datos, hasta 2018 no existían moléculas terapéuticas disponibles que bloqueen el mantenimiento y la propagación de los plásmidos. Por lo tanto, estudiar y conocer sobre, la estabilidad y la transmisión de plásmidos tiene una gran relevancia, ya que dicho conocimiento, puede ayudar a desarrollar estrategias de control novedosas y necesarias para contender con la multiresistencia a los antibióticos [29].

Por otra parte, se sabe que la exposición a metil paratión, genera estrés bacteriano, el cual, podría activar mecanismos de respuesta como la persistencia, similares a los que activan los antibióticos [25,26]. Por lo tanto, demostrar el comportamiento de los plásmidos y los efectos de la exposición a factores estresantes podría ayudar a comprender los mecanismos de estabilidad y segregación de estos, lo cual se relaciona con la propagación de la resistencia a los antibióticos mediada por plásmidos [22].

III. Hipótesis

El estrés inducido por metil parati3n en *S. typhi* genera una respuesta de persistencia, por lo cual la estabilidad del plásmido pHN32, contenido en la bacteria, sufrirá alteraciones.

IV. Objetivos

General

- ❖ Determinar si la exposici3n de *S. typhi* a metil paration modifica la estabilidad del plásmido pHN32.

Particulares

- Evaluar el efecto del metil parati3n como factor de estrés en *S. typhi*.
- Determinar si previo al estrés extremo por metil parati3n se modifica la estabilidad del plásmido pHN32.
- Determinar si existe una variaci3n fenotípica del plásmido pHN32 en *S.typh* para así evaluar si el plásmido se desensambla.

V. Material y métodos

5.1 Cepas, pesticida y plásmido utilizados en este trabajo

Tabla 1. Cepa bacteriana y plásmido utilizado

DESIGNACIÓN	GENOTIPO	REFERENCIA
Cepa RC-1689	Plásmido de cepa clínica	Mendoza <i>et al.</i>
<i>S. typhi</i>		(1993)
Cepa RC-4	hisC10081::MudF(lacZ502::Tn10d-	Cepa obtenida por el Dr. Rafael Camacho Carranza.
<i>S. typhimurium</i>		Mendoza <i>et al.</i>
		(1993)
Plásmido HN32	Tc ^R Sm ^R inestable en <i>S. typhimurium</i>	Mendoza <i>et al.</i>
	Conjugativo	(1993)

El pesticida metil paratión se eligió con base en la toxicidad que se ha reportado, así como en el índice de letalidad, previo a la exposición a bacterias, éste se encuentra en una solución al 62.8%, en xileno. Fue una donación indirecta del laboratorio denominado BAYER CropScience®, obtenida por medio del Instituto de Ciencias de la Atmósfera de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El plásmido utilizado, identificado como pHN32 es conjugativo y además fue aislado de una cepa mexicana, descrito por Mendoza-Medellín *et al.* (1993). Contiene los genes de resistencia a tetraciclina (Tc) y a estreptomomicina (Sm). Originalmente se encuentra en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes no relacionados.

Respecto a los antibióticos utilizados, ambos son de la marca Sigma-Aldrich. La tetraciclina se encuentra como sal pura al 98.0% y la estreptomomicina como sal sulfatada. La concentración de la Tc es 5 mg/ml y la de la Sm es de 10 mg/ml con base en Sambrook [30].

5.2 Cálculo de la concentración mínima inhibitoria

Respecto a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés), la dosis y el tiempo de exposición, se realizó con base en la Dosis Recomendada de Aplicación (DRA) en Rivera [25, 26] para *S. typhimurium*; donde la MIC se obtuvo en una incubación de 30 minutos con el pesticida. En este caso, se expuso a *S. typhi* a diversas concentraciones del pesticida, partiendo de una solución inicial de 0.4085mg/ml en incubación constante, durante un intervalo de 30 minutos. Esto con la finalidad de determinar el volumen del pesticida que previene el desarrollo visible de la cepa. En seguida se realizó un *overnight* (o/n) partiendo de una concentración bacteriana de aproximadamente 1×10^8 UFC/ml a 37°C con agitación a 150 rpm. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en solución de NaCl al 0.85%, tomando 10 μ l del o/n, llevando a un volumen final de 1ml, buscando obtener 1×10^5 UFC/ml. Cada dilución se sembró en medio Nutrient Broth (NB) sólido, dejando en incubación a 37°C, sin agitación por 24 h.

5.3 Estandarización de la bacteria

Se recuperó la cepa RC-1689 a partir de un tubo con DMSO, aislando en siembra por estría en medio sólido de NB no selectivo. Una vez que transcurrieron 24 h, a partir del aislado se incubó 18 h a una temperatura de 37°C a 150 rpm en medio líquido NB con Tc como selector del plásmido. Se incubó en agitación hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0.4 lo cual equivale a $\sim 1 \times 10^8$ UFC/ml.

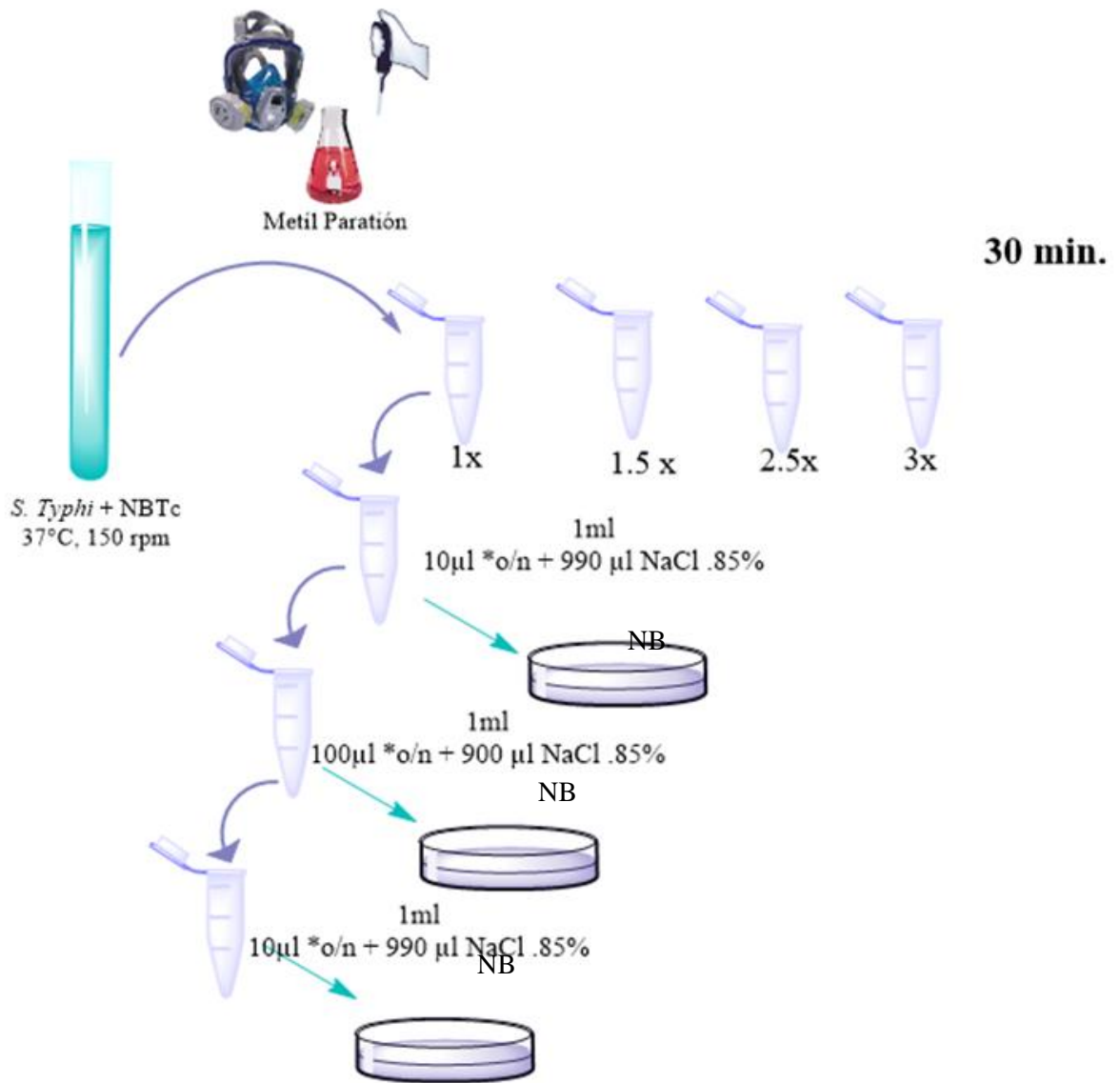


Figura 10. Esquema de metodología para calcular la MIC (concentración mínima inhibitoria)

5.4 Inducción de estrés y caracterización fenotípica

A partir del cultivo estandarizado, se distribuyeron alícuotas de 1ml, con la finalidad de llevar a una fuerza centrífuga relativa o fuerza g de 1816.75 g, por 10 minutos a 37°C en una microcentrífuga NuAire Awel modelo MF20-R. Se decantó el sobrenadante y se adicionó 1ml de solución de NaCl al 0.85%. Se diluyó la pastilla de bacteria con ayuda de la punta estéril, procurando no generar turbulencia en el medio. En seguida se tomaron 100µl de la solución, exponiendo a estrés por pesticida metil paratión, a una concentración 1x, 1.5x, 2.5x y 3x, aforando con NaCl al 0.85%, llevando a un volumen final de 1ml. Se incubaron a 37°C en un intervalo de 2 horas a 150 rpm. Una vez que finalizó el tiempo de incubación, se centrifugó nuevamente con las mismas especificaciones, manteniendo el volumen final de 1ml. A partir de estos tubos se realizaron diluciones seriadas, hasta tener aproximadamente 1×10^2 UFC/ml. Cada dilución se sembró en placas con medio NB sólido no selectivo y se incubó durante 24 h (Fig. 10).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se llevó a cabo conteo viable para cada caja; posteriormente, se seleccionaron 200 colonias al azar, realizando un “master plate” en medio NB sólido sin selector. Incubando por 24 horas a 37°C. Transcurridas las 24 horas, se realizó “replica printing” (R.P.) partiendo de una placa con medio no selectivo (NB). Finalmente, se repitió el patrón en medio selectivo NB con tetraciclina (NBTc), NB con estreptomycinina (NBSm) y NB con ambos antibióticos (NBTcSm) (Fig.11 y anexo 1).

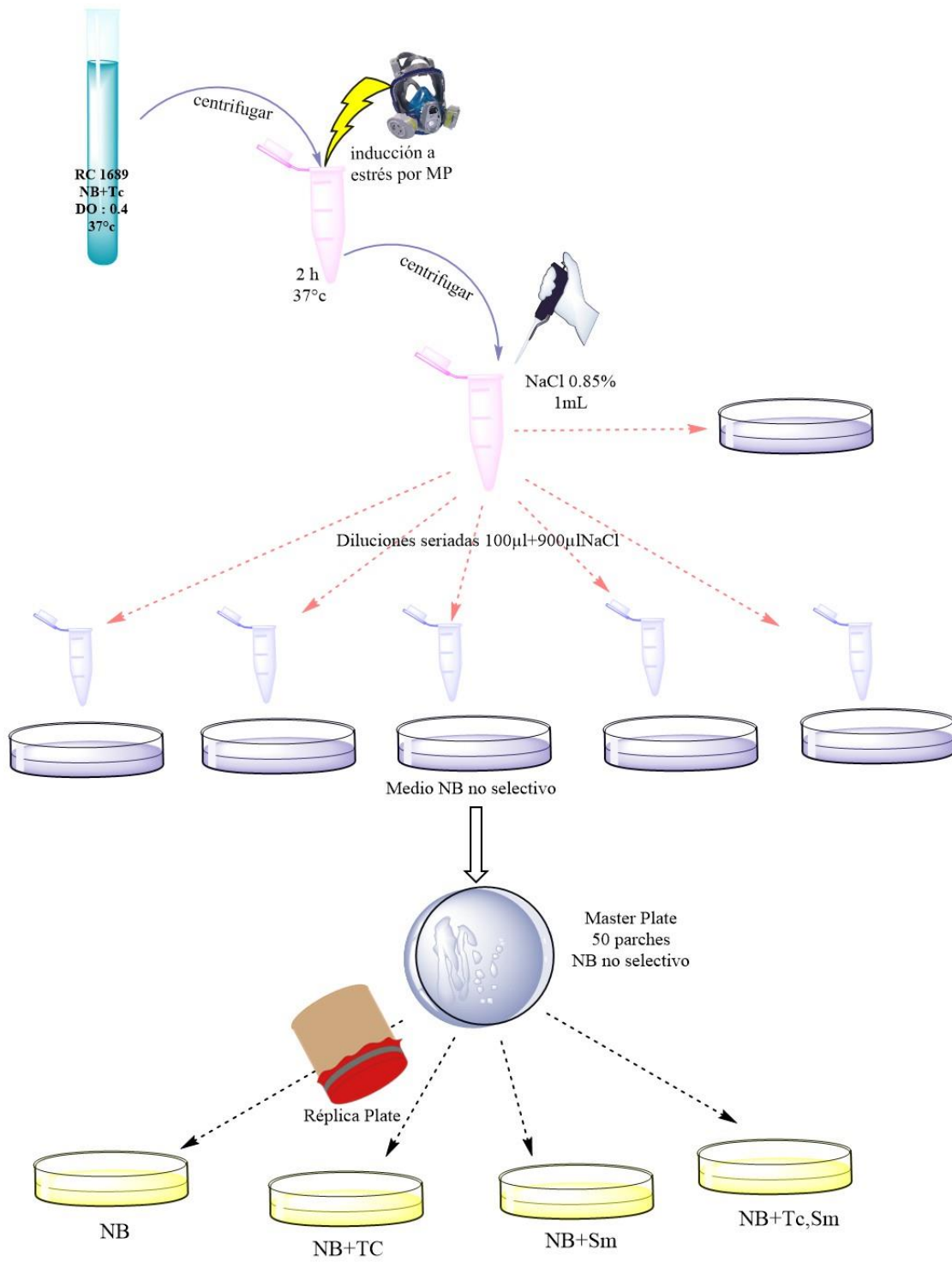


Figura 11. Esquema de Inducción a estrés y caracterización fenotípica

5.5 **Contra selección a la resistencia a tetraciclina**

Para verificar si las células contenían el plásmido y si la supervivencia se mantenía o se perdía, se realizó un ensayo de Bochner. Dicha técnica se basa en que las células resistentes a la Tc son hipersensibles a los agentes quelantes lipófilos, como el ácido fusárico [50]. Se sabe que la expresión de genes de resistencia a la Tc produce alteraciones en la membrana de la célula hospedera, lo cual interfiere con su permeabilidad, confiriéndole resistencia a la misma. Así, un quelante lipófilo (ácido fusárico o ácido quinaldico) en un medio específico se encarga de la inhibición selectiva de las células TcR; se realizó un experimento de contra selección, con ayuda de medio Bochner. Se recuperaron las cepas RC-1689 y RC-4 en medio NB sólido sin selector. Se realizó un o/n en 5 mL de NB líquido más Tc para RC-1689 y NB sin antibiótico para RC-4. Reiniciamos el cultivo hasta alcanzar una DO_{600} de 0.4, equivalente a $\sim 1 \times 10^8$ UFC/ml. Se centrifugó a 1816.75 g a 37°C por 10 min, se decantó el sobrenadante para después adicionar NaCl al 0.85% al botón y llevar al volumen final de 1 mL. Posteriormente se incubó por 2 h a 37°C y una vez transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó nuevamente. Se decantó y desechó el sobrenadante y se adicionó NaCl a 0.85%, llevando a 1mL. Finalmente, se realizaron diluciones seriadas, sembrando cada una en medio Bochner e incubando por 24 y 72 h. A término se realizó un conteo de viabilidad para calcular el índice de pérdida de resistencia a tetraciclina, contenida en el plásmido.

5.6 **Análisis de datos**

Los valores obtenidos se registraron en Microsoft Office Excel 2007. Se utilizó de igual manera el programa GraphPad Prism 8 para elaborar gráficas y ChemDraw Professional 17.0 para elaborar figuras.

VI. Resultados

6.1 Concentración mínima inhibitoria de *S. typhi*

La concentración mínima inhibitoria (MIC) para *S. typhi* es de 0.6127 mg/ml de metil paratión. Recordando que la MIC es la concentración más baja de una solución que inhibe el crecimiento de las bacterias, se tomó como referencia para determinar las siguientes concentraciones a las cuales se expuso la cepa (Tabla 2). Debido a que se utilizó como referencia la metodología de la MIC para *Salmonella enterica* (Tabla 3), se realizó una comparación entre las concentraciones para ambas. En el Anexo 2 se encuentra información adicional.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria de metil paratión que inhibe el crecimiento de *Salmonella typhi*

MIC	[] mg/ml
1X	0.6127
1.5X	0.9190
2X	1.2253
2.5X	1.5316
3X	1.8379

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de metil paratión que inhibe el crecimiento de *Salmonella enterica*

MIC	[] mg/ml
1X	0.4085
1.5X	0.6127
2X	0.8169
2.5X	1.0211
3X	1.2253

6.2 Crecimiento comparativo en presencia de antibiótico

Se observó que a las 4.5 h la bacteria alcanza la DO_{600} de 0.4, lo cual indica que a partir de este tiempo en el medio hay $\sim 1 \times 10^8$ UFC/ml. Esto es una referencia para conocer la concentración bacteriana inicial de la que se partió, así como el número aproximado de bacterias contenidas por mililitro previo a la exposición al agente de estrés. Al comparar el incremento de la DO_{600} a lo largo del tiempo, se observó que en un medio sin antibiótico se alcanza la densidad óptica esperada antes que en un medio con antibiótico (Fig. 12).

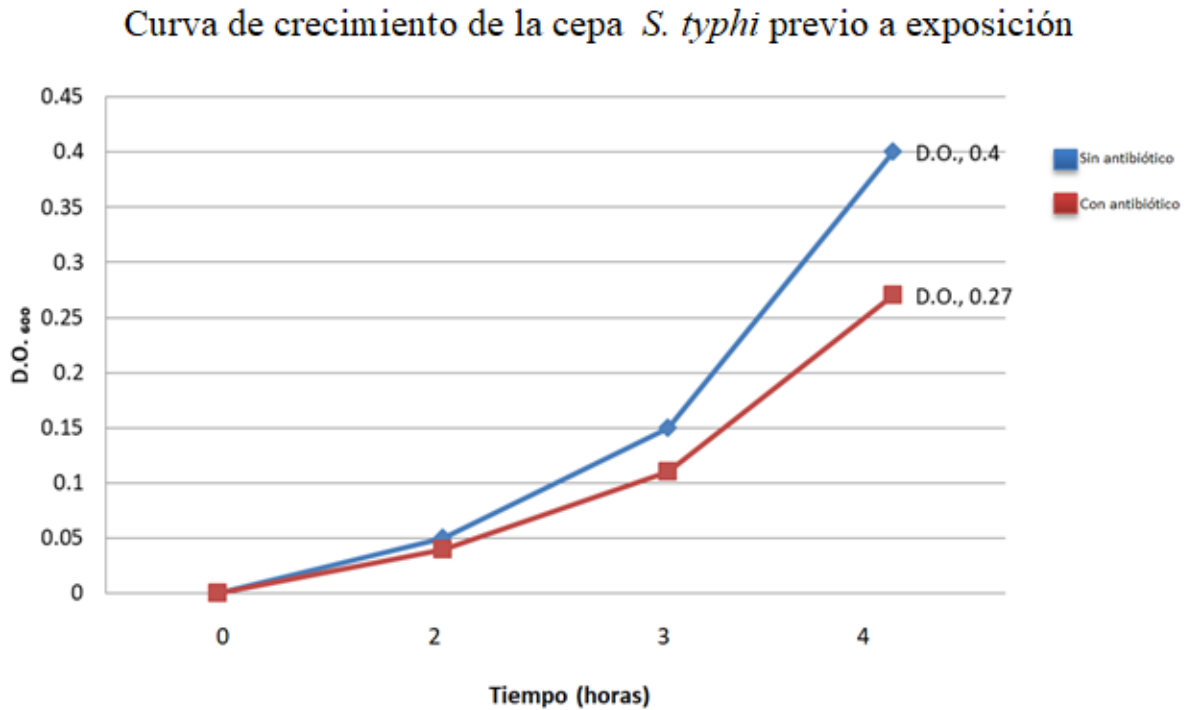


Figura 12. Curvas de crecimiento de la cepa *S. typhi* en medio NB selectivo (Tc) y no selectivo.

6.3 Ensayo de tasa de supervivencia por medio de inducción a estrés por exposición al metilparatión

Con la finalidad de conocer las tasas de supervivencia, posterior al estrés por exposición a metilparatión, se determinó la viabilidad por contabilidad de colonias en diferentes diluciones de los cultivos expuestos y su control. Se encontró que todas las concentraciones disminuyen el porcentaje de supervivencia respecto al control, siendo la de 3x la que mostró el principal descenso. Se tomó en cuenta la exposición a DMSO por daño del disolvente del metilparatión. Se observó que el DMSO afecta la supervivencia pero en niveles menores comparado con los del compuesto activo (Fig. 13).

Relación entre tasa de viabilidad y tratamiento

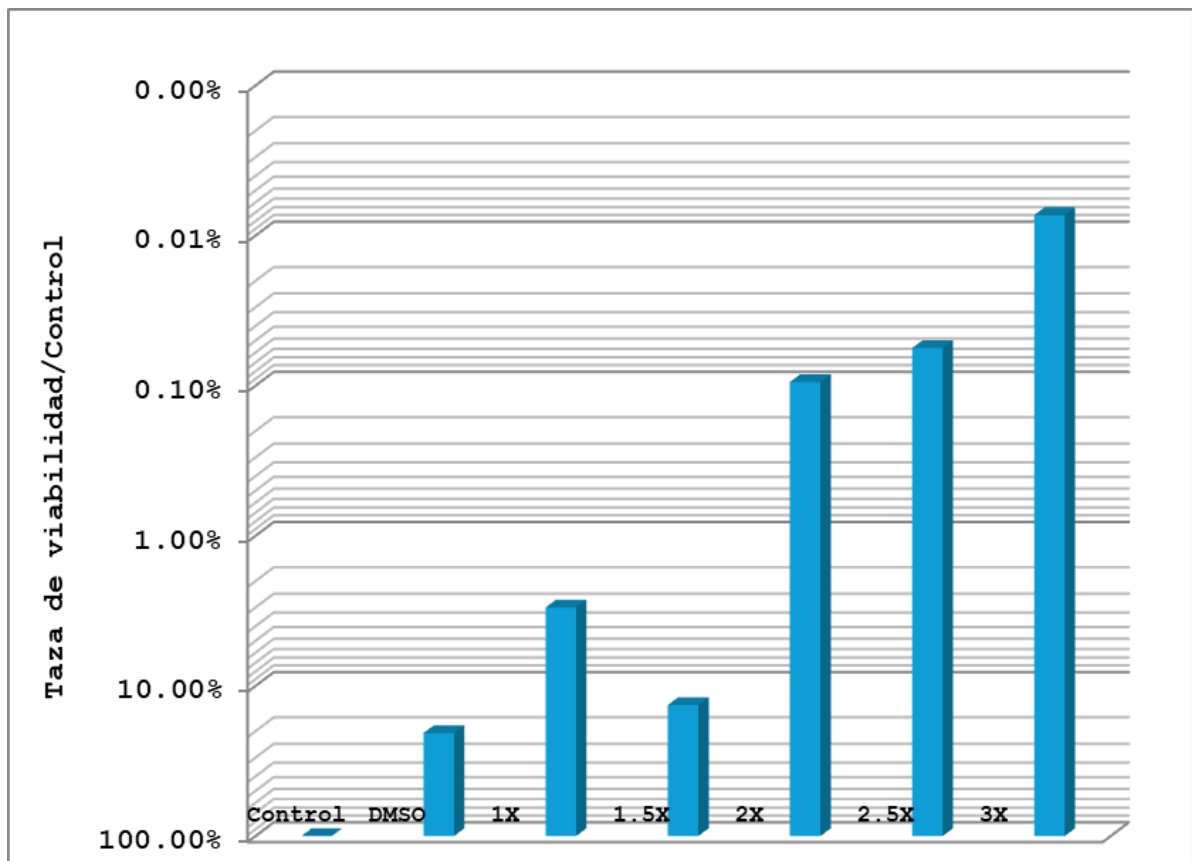


Figura 13. Se muestra el porcentaje de las colonias obtenidas posterior a la exposición a estrés por metilparatión, considerando como referencia el control (C) que equivale a las células sin exposición al pesticida, (1x) que es la MIC para *S. typhi* así como 1.5x, 2x, 2.5x y 3x que es equivalente al número de veces de la MIC (se detalla en la Tabla 2). Se compara el porcentaje de supervivencia respecto al control *versus* el tratamiento empleado.

6.4 Estabilidad fenotípica del plásmido

Una vez que se llevó a cabo el conteo viable, se realizaron cuatro *master plate* de 50 parches cada una, con un total de 200 colonias, en medio NB, NB con tetraciclina (NBTc), NB con estreptomicina (NBSm) y NB con ambos antibióticos NBTcSm. Después de 24 h se realizaron sellos de Lederberg, con la finalidad de observar si se conservaba el plásmido, se desensamblaba o se perdía totalmente, dadas sus características fenotípicas, como es la resistencia a los antibióticos. Se encontró que en tres *master plates* crecieron los 50 parches iniciales, en medio NB, NBTc, NBSm y NBTcSm y en una placa sólo 49 parches en el medio con doble selección (Fig. 14).

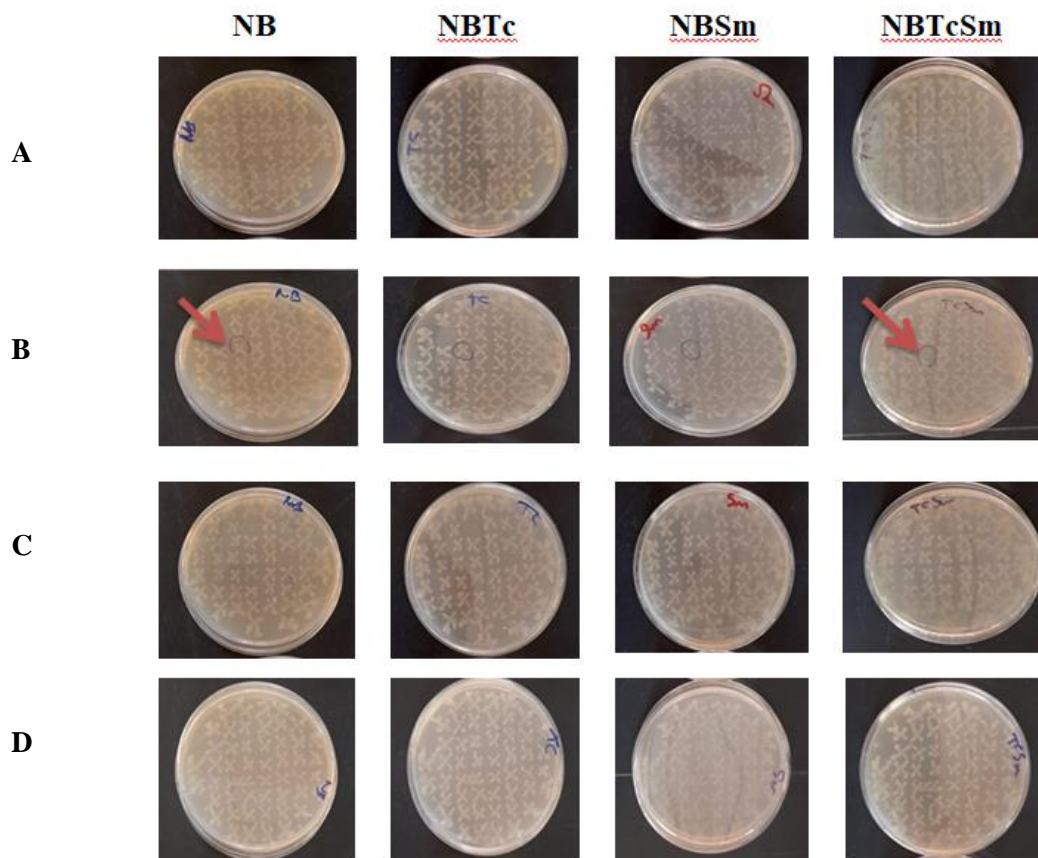


Figura 14. Se muestran resultados de la prueba con sellos de Lederberg, donde se observa el crecimiento de los 50 parches del *master plate* en todas las cajas con selectores (Tc., Sm., y ambos). Se encontró que en la fila B en medio con ambos selectores no hubo crecimiento de un parche. En la primer columna encontramos cajas en medio NB no selectivo, en la segunda cajas con medio NB y tetraciclina como selector (NBTc), en la tercera columna tenemos NB con estreptomicina (NBSm) y en la última columna medio NB con ambos selectores (NBTcSm).

6.5 Contra selección a resistencia a la tetraciclina

Con la finalidad de conocer el índice de pérdida del plásmido, en ausencia de estrés, se realizó una prueba en medio Bochner, tomando como referencia los controles, es decir, las cepas con genes que no codifican para la resistencia a tetraciclina. Debido a que el fundamento del medio es que al contener bacterias sensibles a tetraciclina, se vuelven ácido fusárico resistentes y viceversa. Esto da lugar a un crecimiento visible de las cepas que han perdido la resistencia, ya que el medio Bocher contiene ácido fusárico, entre otros. Realizamos un conteo viable a las 24 y 72 h (Fig. 15). Se encontró que en la concentración 2.5x hubieron $5.6/1 \times 10^6$ sobrevivientes o persistentes. Esto equivale a 0.000056 células sensibles a tetraciclina, mientras que en la cepa que no presentaba resistencia se observó crecimiento desde el día 1 (24 h).

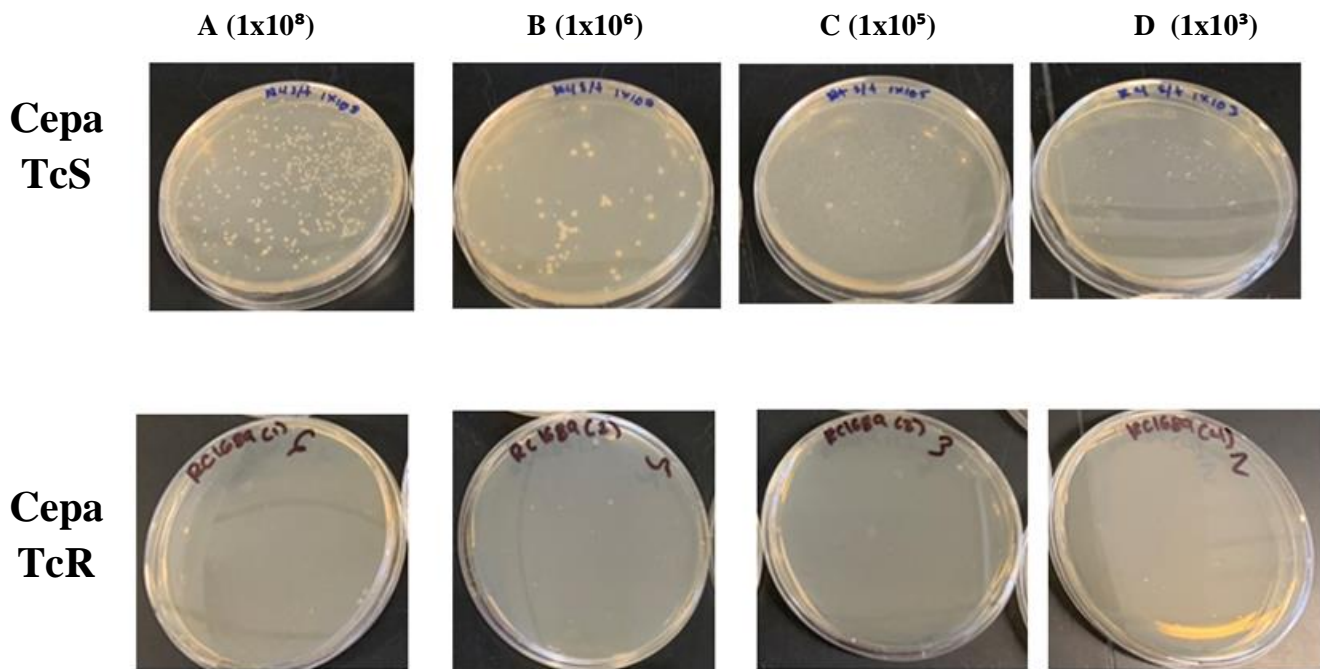


Figura 15. Contra selección por resistencia a tetraciclina, por medio Bocher. La hilera superior muestra a la cepa que no contiene resistencia a tetraciclina (TcS) en su genoma, mostrando crecimiento visible desde las 24h. En la hilera inferior tenemos a la cepa RC1689 la cual es tetraciclina resistente (TcR) mediante su plásmido, el cual codifica para esta resistencia, observando que no hay crecimiento visible hasta las 72h, lo que indica la presencia de células TcS. Observando la comparación en la columna A donde hay mayor concentración de bacterias para ambos casos, sin embargo de la primera hilera hay crecimiento visible a diferencia de la segunda, donde no hay colonias.

VII. Discusión

7.1 La MIC para *S. typhi* vs *S. enterica*

Para conocer la dosis recomendada de pesticida que se debía adicionar al experimento fue necesario elaborar un ensayo en el cual se conociera la concentración mínima inhibitoria de la cepa utilizada (*S. typhi*). El protocolo que se siguió fue el de Rivera-Ramírez (2016), donde se sometió a la bacteria *S. enterica* a diversos pesticidas, encontrando que el metil paratión el que provoca mayor letalidad por lo tanto, fue el que se utilizó en el presente trabajo. Una vez que se obtuvo la MIC para *S. typhi* con el metil paratión, se comparó con el de *S. entérica*, encontrando que la dosis para observar una inhibición del crecimiento bacteriano en *S. typhi* fue mayor respecto al de *S. enterica*. Realizando una relación directa, la MIC para *S. typhi* sería la equivalente al 1.5x de *S. enterica*. Por lo tanto, podría deducirse que ambas bacterias tienen un umbral de reacción diferente al estrés. Dado lo anterior, se esperarían resultados variables con base en los trabajos previos ya citados. También pudo observarse que el 1x del MIC para *S. typhi* equivale a 0.6127mg/ml, debido a que esta concentración logró evitar el crecimiento del 100% de las células tratadas. Sin embargo, en algunos ensayos se observó crecimiento bacteriano y una aparente ausencia de respuesta de estas al exponerlas al pesticida. Lo anterior pudo ser resultado del efecto inóculo, el cual se caracteriza por una disminución del efecto bactericida en infecciones con alto número de bacterias, ya que se encuentran en fase estacionaria disminuyendo las proteínas de unión a los bactericidas en la pared celular [25].

7.2 Las bacterias con medio selectivo mostraron un crecimiento más lento

Se seleccionó a *S. typhi* como modelo biológico debido a su característica multirresistente, a pesar de ser un hospedero pobre de plásmidos. Al plásmido pHN32 el cual es clasificado como un plásmido inestable que se desensambla fácilmente y al pesticida metil paratión, empleado como un inductor de estrés bacteriano. Con la finalidad de conocer cuántas unidades formadoras de colonia aproximadamente serían sometidas al tratamiento, fue necesario estandarizar a la bacteria, considerando que se trabajó con la frecuencia de supervivencia de uno en un millón. Se realizó una curva de crecimiento de la bacteria en medio selectivo (Tc y Sm) y se comparó con la de un medio sin selector, buscando conocer cuántas unidades formadoras de colonia, aproximadamente, se contenían por 1 mililitro. Se encontró que el crecimiento bacteriano en el medio con selectores fue más lento en comparación con el medio sin selectores, lo cual podrían deberse a la carga metabólica o de la aptitud ejercida por el plásmido al

hospedero, que podría implicar una disminución en el crecimiento bacteriano o comprometer el funcionamiento de la maquinaria esencial para la célula.

De modo que las células en medio sin selectores no presentan el costo extra de la maquinaria del plásmido, contrario a los medios con selectores donde se genera una carga metabólica que disminuye el crecimiento bacteriano. Sin embargo, se ha demostrado que en condiciones selectivas existen variantes genéticas emergentes en el plásmido o en el hospedero, que conducen a una reducción del costo de aptitud de este, donde imponer la selección para mantenerlo da lugar a una evolución compensatoria. Por otro lado, se sabe que la imposición de una presión de selección para la presencia de plásmidos, conduce a un fuerte cuello de botella de población, dando lugar a su fijación debido a la deriva génica. De modo que un evento selectivo constituye un barrido selectivo de alelos, manteniendo y fijando a los plásmidos en la población [8,9,31].

7.3 Supervivencia bacteriana posterior a la inducción a estrés por metil parati6n

Los pesticidas se encuentran entre los productos químicos no antibióticos más comunes a escala mundial. Sin embargo, solo el 30 % de éstos actúan sobre las plantas, mientras que el resto permanece en el ambiente. Un artículo publicado en India reporta que para 2019 el uso total de pesticidas alcanzó entre las 2.0 y 3.5 millones de toneladas al año [32]. Las bacterias pueden estar expuestas a pesticidas y antibióticos en entornos tan diversos como el cuerpo humano, granjas, hospitales, hogares, etcétera. Esta exposición puede promover la resistencia de las bacterias a los antibióticos. Debido a que los pesticidas ejercen una presión selectiva sobre las comunidades bacterianas, jugando un papel esencial en la variación de los genes resistentes a los antibióticos y los elementos genéticos móviles, favoreciendo la evolución de las comunidades bacterianas resistentes a los antibióticos. Además de que los pesticidas promueven: 1) la activación de bombas de eflujo, 2) la inhibición de los poros de la membrana externa para la resistencia a los antibióticos y 3) la inducción de mutaciones genéticas. Por otra parte, se sabe que las bacterias aisladas de suelos contaminados con insecticidas mantienen un alto número de copias de plásmidos, lo que podría implicar un aumento del desarrollo de resistencia a múltiples fármacos. Por lo tanto, la exposición a pesticidas tiene el potencial de acelerar la tasa de evolución de la resistencia a los antibióticos. Los efectos de los pesticidas en la diseminación de genes de resistencia a los antibióticos están influenciados por varios factores, como la concentración de pesticidas, el tipo de antibiótico y la estructura bacteriana. Adicionalmente, estos efectos tóxicos pueden inducir resistencia adaptativa a los

antibióticos relacionada con la sobreexpresión de genes o la diversidad genotípica mediante mutaciones o transferencia horizontal de genes [25,26,32,33].

En un estudio [33] se reporta que el estrés por herbicidas incrementa la presencia de genes relacionados con proteínas de membrana, que tienen la capacidad de transferir plásmidos; debido a que el estrés aumenta la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, probablemente debido a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Por otro lado, se promueve la transferencia conjugativa al facilitar el contacto celular a través de una mayor expresión genética codificada por el pilus, disminuyendo la carga de la superficie celular y proporcionando energía adicional para la transferencia de DNA al mejorar la fuerza motriz de los protones [33]. Los pesticidas inducen la transmisión de genes de resistencia a los antibióticos, principalmente promoviendo la transferencia horizontal a través de la transferencia conjugativa, al aumentar la permeabilidad de la membrana celular bacteriana. Está documentado que el estrés puede favorecer la presencia de plásmidos conjugativos, siendo el pesticida un factor relevante de estrés para las bacterias [33]. Por lo tanto es posible que en este trabajo, la exposición de las bacterias al pesticida diera lugar a la conservación y proliferación de los plásmidos.

Los estímulos estresantes exigen una sobreexpresión genética, además de la carga metabólica que ejerce el plásmido sobre el hospedero. Por lo tanto, se espera que la presencia del plásmido se vea comprometida. Sin embargo, se asume que la mayoría de los costos de aptitud de la adquisición de plásmidos provienen de interacciones perjudiciales específicas entre plásmidos y genes cromosómicos. Como consecuencia pequeñas mutaciones, como cambios de una sola base, pueden ser suficientes para adecuar un plásmido muy grande. Por otro lado, se han identificado mutaciones compensatorias de plásmidos con efectos pleiotrópicos que comprometen el funcionamiento de la maquinaria del plásmido. Sin embargo, también se ha documentado la presencia de mutaciones individuales que permiten compensaciones moleculares entre el plásmido y la bacteria. Por consiguiente, se propone que la supervivencia bacteriana del experimento es resultado de una interacción entre el estrés del medio y la carga metabólica del plásmido, donde inicialmente, a nulas o bajas concentraciones podía existir una compensación entre la carga metabólica y la expresión génica previo al estrés. Sin embargo, al aumentar la concentración del pesticida aumenta la probabilidad de interacción entre la maquinaria del plásmido y la de la bacteria suponiendo un carga excesiva o, en su defecto, la interacción de estas dando lugar a la muerte celular. Se ha encontrado en la literatura que niveles bajos de exposición pueden actuar como

estimulantes o señales de inicio de la transcripción, mientras que dosis elevadas pueden provocar la activación de mecanismos globales de respuesta al estrés [33].

7.4 Persistencia por pesticida en cepa de importancia clínica

Los persistentes o células persistentes bacterianas son variantes transitorias de una población genéticamente homogénea, que pueden sobrevivir a la exposición de estrés, como antibióticos y pesticidas, generando latencia celular. Se han relacionado genes y vías que intervienen en la formación de persistentes como el de los módulos T-A, la respuesta estricta por ppGpp, la reparación o protección del DNA (respuesta SOS), metabolismo reducido del fosfato, estrés celular, limitación de nutrientes, producción de energía alternativa, inhibición en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, degradación de proteínas, transportadores/sistemas de eflujo y reguladores transcripcionales, así como tensiones más generales, tales como pH extremo, choque térmico, radiación, defensa antioxidante, fagos, las biopelículas y macrófagos [27]. Una de las principales toxinas responsable de la formación de persistentes en respuesta SOS, es la toxina TisB la cual interrumpe la fuerza motriz protónica, conduciendo a la disminución de los niveles de ATP y como consecuencia, a la inactivación celular [27]. En el laboratorio donde se realizó este estudio “hay datos preliminares que confirman que diversos pesticidas son capaces de inducir la selección de colonias persistentes” (R. Camacho, X. Rivera, comunicación personal, 17 de agosto de 2023). Debido a que se usó la misma metodología que (Rivera, 2016) es probable que en las células sobrevivientes posterior a estrés por metil paratión se encuentren células persistentes. Sobre todo en las concentraciones de 2.5x y 3x, ya que se sabe que entre los mecanismos relacionados con la persistencia se encuentran los módulos T-A, que activan la muerte celular programada en respuesta al estrés, así como daño al DNA, Por lo tanto, se asume que existe una relación proporcional entre estrés y daño celular con la persistencia. Por otro lado, se da lugar a la activación del sistema SOS, el cual interviene en la producción de *biofilms*, además de contribuir a la reparación del DNA e inducir el desarrollo de módulos T-A [25, 27].

7.5 Estabilidad plasmídica

I. El estrés genera la activación de los sistemas de protección que a su vez favorecen la transferencia conjugativa

En este trabajo se buscó determinar si la estabilidad plasmídica de la cepa utilizada se conserva aún después de someter a las bacterias a un estado de estrés extremo por metil paratión. Se encontró que de 200 colonias que se probaron en varias *master plate* después del tratamiento, solamente una no creció en medio selectivo para el plásmido. Esto indica que el plásmido fue estable en la población y que además se conservó durante algunas generaciones. Entre los factores más estudiados que influyen en la estabilidad plasmídica se encuentra la conjugación, la cual se considera que puede estar mediada por los plásmidos, favoreciendo la presencia y mantenimiento de éstos. Es probable que el uso intensivo de antibióticos, pesticidas u otros factores estresantes estimule la transferencia conjugativa, dando lugar a una selección de plásmidos que confieren resistencia a los antibióticos en el ambiente y entornos clínicos, induciendo cambios adaptativos en la comunidad microbiana. La eficiencia de la conjugación puede variar bastante entre una misma cepa, entre plásmidos, incluso entre integrantes de la misma colonia. Otro aspecto relevante es que durante la conjugación, el plásmido ingresa a la célula como DNA monocatenario, dando lugar a una activación transitoria de la respuesta SOS, aumentando las tasas de mutación y de recombinación. Esto promueve la transferencia de plásmidos al activar genes necesarios para la transferencia y a su vez inducen la inhibición de la división celular. Debido a que dicha respuesta puede mantenerse varias generaciones, es posible que se dé lugar a mutaciones cromosómicas compensatorias, promoviendo la adaptación del hospedero a su plásmido y por ende, disminuyendo el costo de éste. No obstante, podría decirse que la inducción de SOS conduce a la diversificación genética de elementos móviles conjugativos, así como su transferencia a otras bacterias, dando lugar a la diseminación de genes multirresistentes a los antibióticos, además de acelerar el cambio genético y la evolución a la resistencia en poblaciones patógenas [13,34,35]. Existen genes que inducen la monomerización de multímeros que entran a la célula, favoreciendo la estabilidad plasmídica, como el sistema *res-tnpR* en el transposón TN100, o el plásmido RP4, el cual lleva al gen *parA* (partición), el cual monomeriza los multímeros [37]. Por otro lado, se ha encontrado que la selección de plásmidos por antibióticos favorece la formación de multímeros y, por lo tanto, las condiciones selectivas fluctuantes, como los antibióticos, pesticidas u otros, pueden imponer fuertes cuellos de botella en la población, ya que pueden conducir a la fijación rápida de variantes de plásmidos estables en un linaje bacteriano [8,9,36,37].

II. El número de copias del plásmido más interacción con el entorno abiótico impacta en la estabilidad plasmídica

El número de copias del plásmido es un factor clave para la estabilidad del mismo en la población, ya que se ha encontrado que existen mutaciones que pueden aumentar o disminuir el número de las mismas. Un ejemplo es el plásmido pBR322, el cual inicialmente mantiene un número de copias medio, pero una mutación de un solo punto en el gen *RNA I* del control de replicación resulta en un plásmido de alto número de copias. Otro caso es el gen *COP*, el cual al modificarse da lugar a un aumento en el número de copias en el plásmido pSC101 [37]. Lo mismo ocurre con la proteína RepA (replicación, helicasa), la cual es codificada por *COP* y se requiere para la replicación, misma que al cambiar su propiedad de unión en el DNA a través de una mutación puntual, aumenta el número de copias del plásmido. En casos inversos, una mutación por delección también puede producir números de copias más bajos o detener la replicación por completo [37]. Como se ha mencionado anteriormente, las mutaciones pueden ser inducidas por factores de estrés, tales como antibióticos, pesticidas u otros factores abióticos, incluyendo la limitación de nutrientes. Se ha encontrado que dicho estrés puede dar lugar al aumento de número de copias. Esto se debe a que las tasas de crecimiento disminuyen y la biosíntesis de proteínas se detiene parcialmente, dando lugar a la interrupción de la replicación del DNA cromosómico relacionado con *oriC*. Sin embargo, la producción de los plásmidos sigue en marcha, ya que depende de otra secuencia *ori*. Por otro lado, la adición de etanol puede influir también en el número de copias, mejorando la estabilidad del DNA plasmídico, debido a que los cambios en la membrana celular tienen un efecto sobre la replicación de un plásmido. Lo anterior se explica con el hecho de que el DNA se une a la membrana durante la duplicación. Como resultado, el tratamiento de las células con etanol conduce a un aumento del número de copias del plásmido [37].

Otro factor abiótico que influye es la temperatura; se ha documentado que la estabilidad del plásmido se reduce a temperaturas más altas. Esto se debe a que las proteínas de replicación son termosensibles conduciendo a una pérdida total del plásmido con el aumento de la temperatura, mientras que en el caso contrario, la estabilidad también es menor cuando se baja la temperatura del cultivo. Los medios de cultivo también muestran diferentes efectos sobre la estabilidad. Los que contienen altos índices de glucosa muestran una mayor estabilidad segregacional del plásmido, contrario a los que contienen glucosa como fuente de carbono limitante. Así mismo, los medios mínimos conducen a una mayor estabilidad del plásmido que la adición de aminoácidos. Por otro lado, cambiar la proporción de carbono a nitrógeno a un contenido de carbono más alto reduce la estabilidad del plásmido. Una forma de asegurar que el

plásmido se mantendrá en la población, es una distribución correcta de los mismos, de esta forma al menos un plásmido se moverá a cada célula hija durante la replicación. Las proteínas de replicación DnaA y DnaB tienen efectos sobre la partición de plásmidos. DnaA juega un papel importante durante la replicación tanto del cromosoma como del plásmido, mientras que DnaB muestra actividad helicasa que desenrolla hebras, debido a que la partición activa del plásmido puede estar acoplada con la unión de los plásmidos a la membrana. Las enzimas implicadas en la biosíntesis de los principales componentes de la membrana influyen en la misma. Por otro lado, si el número de copias es alto hay mayor probabilidad de que al menos un plásmido esté presente en cada una de las dos mitades de una célula en división. El número de copias del plásmido en las células bacterianas depende de la frecuencia de inicio de su replicación y puede variar considerablemente según la tasa de crecimiento celular. Los modelos predicen que un número de copias de al menos 20 plásmidos por célula conduce a una estabilidad segregacional del 100 %. La proteína Rom reduce la variación en el número de copias de plásmidos y reduce la tasa de pérdida del mismo [37,38].

III. Influencia de la adaptación plásmido-hospedero

La adaptación plásmido-hospedero puede verse facilitada por la evolución del material genético del primero. Está demostrado que una sustitución de un solo nucleótido en el gen de replicación *trfA* de IncP-1 aumenta la presencia del plásmido, mediando la adaptación a una nueva gama de hospederos bacterianos [9]. Otro estudio demuestra que una inserción puede inducir una eliminación a gran escala de la maquinaria de conjugación del plásmido, lo que resulta en una reducción del costo de aptitud del plásmido, por lo tanto de la adaptación plásmido-hospedero [9]. No obstante, la adaptación del plásmido a través de la evolución del cromosoma hospedero es más frecuente en comparación con la evolución del propio plásmido. En 1988 se demostró que las mutaciones que alivian el costo de aptitud del plásmido están ubicadas en el cromosoma hospedero en lugar del plásmido. En otro trabajo se reporta que pNUK73, previo a mutaciones en un gen de helicasa o proteína quinasa, influye en la interacción del hospedero con la proteína de replicación del plásmido, aumentando su mantenimiento. La adaptación plásmido-hospedero proporciona una explicación de la presencia de plásmidos costosos después de una fuerte selección. No obstante, la presencia de los mismos a largo plazo en un hospedero previamente adaptado puede depender de la aptitud de las mutaciones compensatorias, mismas que pueden verse desfavorecidas en ausencia de selección para el rasgo del plásmido. Las mutaciones compensatorias

también pueden modular otros procesos clave relacionados con el mantenimiento del plásmido como: 1) procesos involucrados en la conjugación; 2) disminución de la expresión génica global; o 3) el aumento del número de copias de plásmidos. Finalmente, las mutaciones compensatorias que ocurren en el cromosoma del hospedero o del plásmido durante la coevolución pueden aliviar los costos del plásmido, lo que disminuye la fuerza de selección contra éste [39,40].

En otro sentido, es posible que el estrés inducido por el pesticida genere mutaciones, que a su vez favorecieran adaptaciones compensatorias por parte del plásmido, el hospedero o ambos, dando como resultado, la estabilidad plasmídica y coevolución compensatoria. Dicha coevolución o compensación plásmido-bacteria pudo derivarse de mutaciones cromosómicas y/o plasmídicas, disminuyendo el costo del transporte del plásmido, reduciendo la selección en su contra, asegurando su presencia durante varias generaciones, tomando en cuenta también una conjugación exitosa, rápida no costosa. Corroboramos que el pesticida es un factor de estrés, ya que se hizo una relación entre las bacterias expuestas *versus* las que no se expusieron. Se encontró que las bacterias no expuestas se mantienen e incluso podían continuar su crecimiento, mientras que la población de las bacterias expuestas disminuyó.

Las mutaciones que mejoran la conjugación, disminuyen la pérdida segregacional o alivian el costo de aptitud de los plásmidos que codifican la resistencia a los antibióticos, lo que permiten que los plásmidos persistan mejor en ausencia de fármacos. Estos mutantes sirven como una fuente estable que puede propagar la resistencia a nuevas cepas y especies. Si los hospederos receptores ya son resistentes a un antibiótico, se produce una multirresistencia [38]. Se esperaría que donde se dio lugar la evolución previa habría mayor probabilidad de que los huéspedes adquieran múltiples plásmidos. Sin embargo, los plásmidos mutantes pueden persistir más tiempo en los nuevos hospederos y los mutantes pueden retener mejor los nuevos plásmidos, encontrando que las mutaciones cromosómicas compensatorias que aumentaron la presencia de un plásmido coevolucionado, también permitieron que el mismo hospedero mutante retuviera mejor los plásmidos alternativos, un ejemplo de pleiotropía y un fenómeno denominado "permissividad del plásmido". En algunos casos, se ha demostrado que las mutaciones compensatorias únicas en genes reguladores mejoran por completo el costo del transporte de plásmidos [38]. También se ha demostrado que las mutaciones compensatorias apuntan a la conjugación, dando lugar a tasas reducidas conjugación en plásmidos. Ya sea indirectamente, como resultado de cambios regulatorios a gran escala, o directamente a través de mutaciones que afectan a los genes involucrados en el proceso de conjugación [41].

Como ya se ha mencionado, los niveles bajos de exposición a factores estresantes podrían actuar como un estimulante o una señal para la transcripción de genes únicos, mientras que una dosis elevada, puede provocar la activación de regulones completos que forman parte de los mecanismos de respuesta al estrés. En un número considerable de casos, se ha encontrado que la exposición a antibióticos, choques térmicos, represión de sistemas de modificación de restricción, dodecilsulfato sódico o etanol, entre otros, favorece la recepción de plásmidos. Por el contrario, también se ha documentado que en *Escherichia coli*, el estrés dirigido a la envoltura celular induce la expresión de genes asociados a CRISPR (CRISPR-cas), que servirían como una defensa intracelular contra el DNA extraño, disminuyendo así la permisividad. Cada uno de estos casos se describe para cepas específicas bajo condiciones de estrés específicas, no existe un mecanismo general de respuesta al estrés bacteriano, ya que varían de acuerdo a las mismas [42]. Cada plásmido así como cada célula hospedera, se comporta de diferentes maneras, con base en las características de cada uno. Por lo tanto, es necesario obtener más datos sobre el número de copias y la estabilidad de cada sistema de expresión o en conjunto. Esto podría explicar la relación entre el incremento del metil paratión, *versus* la supervivencia bacteriana.

De esta manera, como consecuencia de la diversidad de plásmidos es difícil predecir cómo interactúan los genes codificados por los mismos con las redes reguladoras bacterianas. Se podría esperar que la adaptación del plásmido causara efectos transcripcionales relevantes en múltiples genotipos de hospederos. Por el contrario, entre los pocos estudios comparativos existentes, parecería que cada emparejamiento de bacteria y plásmido tiene un perfil de expresión diferente y único. Sin embargo, tales estudios suelen utilizar cepas bacterianas aisladas de diferentes hábitats; mientras tanto, el huésped natural del plásmido a menudo se desconoce. Por lo tanto, se requieren estudios futuros que comparen los efectos transcripcionales de los plásmidos en los huéspedes con los que coexistieron en la naturaleza dentro de comunidades ecológicas [43,44].

Es posible que el plásmido, de células sometidas a estrés, acumulara mutaciones, las cuales pueden compensarse de diferentes maneras, una de ellas cambiando el número de copias, o bien, modificando su distribución en la célula para mejorar su permanencia, que se refleja en que ambas células hijas portaran el plásmido. Quizá también exista una conformación monomérica en los plásmidos, lo cual favoreció su conservación. Incluso podríamos apuntar a una coevolución compensatoria entre el plásmido y el hospedero. Esto derivado de iniciar el cultivo con selectores para el mismo. En este estudio se podría considerar que se tuvieron varios inductores, como el antibiótico, el cual estuvo diluido en etanol, que a su vez, como se ha mencionado, puede influir en el aumento del número de copias y, por ende en la

conservación del plásmido. Partiendo de los supuestos anteriores, es posible proponer que la presencia del plásmido durante varias generaciones es resultado de varios factores. Esto debido a que en diversos estudios se encuentran discrepancias en cuanto a los resultados de la contención del plásmido ante diversos estímulos, por lo cual es posible que interactúen diversos elementos que den lugar a la presencia del plásmido.

7.6 *Hok/sok* involucrado en la competencia entre plásmidos

El locus de toxina/antitoxina (*hok/sok*), como ya se ha mencionado está relacionado con el mantenimiento de plásmidos. Además, están asociados con elementos de respuesta al estrés que ayudan a las bacterias a sobrevivir en condiciones de crecimiento desfavorables. Esto se debe a que el locus *hok/sok* retrasa el inicio del crecimiento de cultivos de células bacterianas, permitiendo que las células crezcan rápidamente en una etapa posterior a pesar de la temperatura de crecimiento predominante. Ahora bien, se sabe que el estrés por temperatura estimula el crecimiento rápido de las células *hok/sok+*, inhibiendo el crecimiento de las células *hok/sok-*. Se realizó un estudio [45] donde se comparó el crecimiento de las células *hok/sok+* con el de las *hok/sok-* en medios selectivos y no selectivos; se encontró que las células *hok/sok+* sobrevivieron y crecieron bien en condiciones de altas concentraciones de ampicilina, en contraste con las células *hok/sok-* lo que indica que el locus *hok/sok* está involucrado en el crecimiento celular. Así mismo, el locus *hok/sok* aumentó la fase de latencia y la tasa de crecimiento exponencial en todas las cepas utilizadas, lo cual implica que el locus *hok/sok* inhibe el inicio del crecimiento de las bacterias, permitiendo procesos de adaptación a las condiciones de crecimiento y las prepare para sobrevivir en condiciones de estrés. Esta conclusión está respaldada por la observación de que las células *hok/sok+* sobreviven mejor bajo estrés por temperatura. Esto indica que el locus *hok/sok* confiere una ventaja selectiva a las células hospederas cuando crecen en condiciones adversas. Se sabe que el locus *hok/sok* mejora el crecimiento de las células en cultivos de baja densidad celular, especialmente a altas temperaturas de incubación, ya que se inhibiría temporalmente el crecimiento celular, dando tiempo a las células para producir suficiente β -lactamasa para destruir el fármaco antes de que se reanude el crecimiento, además el locus puede complementar funcionalmente la respuesta SOS. Se documentó que la capacidad de las células *hok/sok+* para prosperar en condiciones de baja densidad celular y alta temperatura podría ayudar a las células a sobrevivir durante momentos de estrés [45]. En este trabajo encontramos que el sistema toxina-antitoxina o muerte postsegregacional,

juega un papel importante en la estabilidad plasmídica. Sin embargo, no todos los autores consideran que este factor sea relevante, ya que se ha documentado, que dichos sistemas están más involucrados en la competencia entre plásmidos, por lo cual se aborda desde otra perspectiva [45].

7.7 Caracterización fenotípica

La familia de antimicrobianos de las tetraciclinas inhibe la síntesis de proteínas, esto al evitar la unión de aminoacil-tRNA al aceptor ribosómico(A) en el 30s ribosomal. Sin embargo, la creciente incidencia de resistencia a las tetraciclinas en *Salmonella* spp. de origen humano y animal se ha informado en todo el mundo. Además de los mecanismos de resistencia mediados por la bomba de expulsión, la resistencia a las tetraciclinas puede involucrar proteínas de protección ribosomal (RPP por sus siglas en inglés). Las RPP son un grupo de proteínas citoplasmáticas que pueden unirse al ribosoma, dando como resultado la liberación de la Tc del ribosoma, permitiendo la síntesis de proteínas. Hasta la fecha, se han identificado 12 genes de resistencia a la Tc que codifican RPP, incluidos *tetM*, *O*, *Q*, *S*, *T*, *W*, *B (P)*, *otr(A)* y *tet* [32,36,44] Muchos de los determinantes de RPP se encuentran en elementos genéticos móviles, como transposones o plásmidos dentro de *Salmonella*, facilitando su propagación a través de las eubacterias, por eventos de transferencia lateral de genes. Por otro lado, la Sm se une al RNA ribosómico 16s rRNA y la proteína s12 de la 30s ribosomal, bloqueando el complejo de iniciación, así como la unión del tRNA al sitio A del ribosoma. La interrupción de la biosíntesis de proteínas, a su vez, provoca la permeabilización de la membrana celular, responsable de gran parte de los efectos bactericidas de la Sm [46,47].

El mecanismo de resistencia de la Sm se basa en la inactivación por modificación enzimática, las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME por sus siglas en inglés) son la causa más común de resistencia a los aminoglucósidos. Las AME catalizan la modificación covalente de los aminoglucósidos a medida que se transportan a través de la membrana citoplasmática, modificando los grupos amino o hidroxilo. Hay tres tipos de AME: (1) N-acetiltransferasas (AAC), que acetilan el grupo -NH₂ (amino) por N-acetilación; (2) O-nucleotidiltransferasas (ANT), que adenilan los grupos hidroxilo mediante O-nucleotidilación; y (3) O-fosfotransferasas (APH), que fosforilan los grupos hidroxilo mediante O-fosforilación. Las modificaciones del aminoglucósido reducen la unión del fármaco al ribosoma, dando como resultado niveles altos de resistencia. Los genes que codifican para AME son altamente móviles, ya que tienen la capacidad de transferirse, como parte de integrones, casetes de genes, transposones, elementos conjugativos integrativos o mediante conjugación por plásmidos. La capacidad de evolución

de los genes que codifican estas enzimas, así como los numerosos elementos móviles donde se encuentran, dan lugar a una alta adaptabilidad de los AME para diseminarse entre las bacteria [47].

Se realizaron réplicas tipo printing en medio NB, NBTc y NBSm, y NBTcSm con un total de 200 parches, encontrando que solamente un parche no tuvo crecimiento en el medio con ambos selectores. Esto puede deberse al funcionamiento y sitio de acción de ambos antibióticos. Dado que ambos antibióticos, Tc y Sm, actúan sobre el 30s ribosomal, en el sitio A y P respectivamente, podría afectar la síntesis proteica, comprometiendo la poza de ATP o NADPH. Esto a su vez se relaciona con la expresión de las bombas de eflujo, ya que estas funcionan por moléculas energéticas. Tal es el caso de la bomba de eflujo AcrAB-TolC. La cual es un complejo tripartito, que consta de una proteína de fusión de membrana periplásmica AcrA, una proteína transportadora de membrana citoplasmática AcrB y un canal de membrana externo TolC, siendo la más eficaz para producir *Salmonella* multirresistente, contribuyendo a la resistencia a las fluoroquinolonas, cloranfenicol y tetraciclinas. Debido a que se involucran moléculas fundamentales en dicho proceso, es posible que la unión de la respuesta a ambos antibióticos dé lugar a muerte celular, aunque no necesariamente implica la pérdida del plásmido [46,47].

Estos datos se comparan con base en resultados previos [16], para los que se realizaron experimentos de apareamiento entre *E.coli* y *S. typhi* con respecto a la estabilidad de sus marcadores de resistencia en experimentos de cultivo en serie. Se encontró que cada uno de ellos pierde un marcador de resistencia, resultado de una deleción, para más adelante segregarse. Proponiendo que dicho fenómeno es resultado de deleciones que posiblemente afecten mecanismos involucrados con la estabilidad plasmídica y a su vez asociados con el fenotipo de pérdida de algún marcador de resistencia. Respecto al plásmido que utilizamos en este trabajo (pHN32) se observó una pérdida rápida del marcador Tc, pero una disminución muy lenta del marcador Sm, de modo que aproximadamente el 60 % de las bacterias aún retenían el marcador Sm después de unas 150 generaciones. Por otra parte, en los cultivos seriados en presencia de antibióticos se elaboró un patrón de comportamiento donde, en presencia de Tc no se obtuvo ninguna colonia de Sm, pero en presencia de Sm el número de colonias de Tc aumentó rápidamente. Respecto a la deleción para este plásmido, la referencia indica que fue de aproximadamente 4.5 kb. Lo anterior arroja que los plásmidos son desensamblados fácilmente en *S. typhi* respecto a *E.coli* y que el plásmido pHN32 tiene una pérdida con una cinética más baja respecto a otros plásmidos.

Más adelante, en otro estudio [28], profundizaron sobre el tema, encontrando que los plásmidos tienen una pérdida simultánea con una cinética rápida, de modo que después de 50 generaciones,

aproximadamente el 90 % de las bacterias pierden el plásmido. Hallando también otro DNA más grande y que migra más lentamente, con relación al DNA pequeño y monomérico inicial. Se propone lo siguiente con respecto a dicho material genético: (1) es un intermediario de replicación-segregación que no se resuelve en las dos copias de plásmido involucradas; o (2) es una estructura dimérica producida por procesos dependientes de la recombinación, incapaz de resolverse en sus copias de plásmido monomérico. Lo anterior resultado de las deleciones que probablemente contienen información necesaria para la resolución de multímeros. En dicho trabajo se demostró que la pérdida de marcadores de resistencia mediada por deleción es un proceso dependiente de RecA, ya que en cepas que contienen *recA1* en *S.typhi* son estables comparadas con las deficientes de RecA.

RecA es una recombinasa dependiente de ATP, es la enzima central para la recombinación homóloga del DNA, además de ser un agente promotor de la autólisis de LexA en bacterias. Por otro lado, contribuye a la reparación de horquillas de replicación de DNA estancadas y colapsadas mediante vías de reparación posteriores a la replicación, desempeñando un papel importante en las vías de tolerancia a lesiones de DNA. Del mismo modo RecA participa en la transferencia horizontal de genes entre diferentes cepas lo que también provoca diversidad genética. Después de unirse a ssDNA, el complejo de filamento RecA/ssDNA puede servir como una señal de daño en el DNA, lo que da como resultado la autoescisión de LexA, lo que activa la respuesta SOS, aumentando la expresión de genes reprimidos por LexA. Por su parte *recA1* reduce la resistencia a la radiación UV y la capacidad de inducción del gen SOS [48].

7.8 Importancia de la estabilidad plasmídica en la salud pública

Se han documentado infecciones bacterianas en vesícula biliar por persistentes en casos de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi. Las infecciones asintomáticas persistentes también pueden ser causadas por bacterias latentes de crecimiento detenido y se asocian con recaídas de infecciones sintomáticas agudas. La fiebre tifoidea se repite en el 15 % de los pacientes después del tratamiento con antibióticos, y luego de una infección del tracto urinario causada por *E. coli* uropatógena, el 27 % de las mujeres sufrirá una recaída. Aunque se postula que la tolerancia a múltiples fármacos en persistentes es un fenómeno fenotípico, es posible que bajo ciertas condiciones los persistentes adquieran mutaciones y desarrollen resistencia genotípica. La persistencia parece ser un fenómeno generalizado, aunque, diferentes especies bacterianas parecen tener diferentes capacidades de persistencia *in vitro* e *in vivo*, con distintos grados de dificultad para el tratamiento [49].

7.9 **Contra selección a tetraciclina resistente**

El fundamento de esta técnica es que los cationes divalentes están involucrados en la permeabilidad de la Tc, ya que estas existen como iones dipolares a pH neutro y se unen fácilmente a cationes en solución y en las superficies de las membranas. Probablemente la neutralización de la carga negativa tras la unión del catión facilita el movimiento a través de la membrana citoplasmática [50]. Por su parte, respecto a las bacterias TcR, se caracteriza una desaceleración de la permeabilidad de la Tc, especialmente en la etapa de la absorción inicial. El principal mediador de este cambio parece ser una proteína de 34.000 o 36.000 de peso molecular (llamada proteína TET) que se sintetiza y se inserta en la membrana citoplasmática [50]. Con base en lo anterior, se sugiere un mecanismo para el retraso de la entrada de tetraciclina por la llamada proteína TET. Proponiendo que la proteína TET reduce la concentración efectiva de una o más especies de iones metálicos en la membrana citoplasmática, retardando considerablemente la permeación de la Tc. Sin embargo, si estos iones metálicos en la membrana cumplen una función esencial como ayudar a mantener la integridad de la membrana, entonces una célula TcR inducida, que tiene una concentración efectiva más baja, será más vulnerable a los agentes quelantes. A medida que se debilita la integridad de la membrana, la alta concentración de Na⁺ puede generar un estrés electrolítico adicional en la célula y promover la lisis celular. En otras palabras, la bomba de Tc saca la Tc, introduciendo ácido fusárico [50]. En nuestros resultados se observó un crecimiento celular lento, ya que a las 72 h encontramos pequeñas colonias, lo cual demuestra que sin la inducción de un selector existe una pérdida de resistencia dejando únicamente células sensibles.

En este trabajo se buscó determinar, después de la exposición al pesticida metil paratión, la tasa de recombinación plasmídica que antecede a su pérdida en la población, y compararla con la ya determinada en condiciones sin estrés. Los hallazgos permiten sugerir que posterior al estrés intenso, en el cual observamos a las células persistentes salir de este estado, no hay eventos recombinogénicos detectables, por lo cual no fue posible hacer las pruebas comparativas, como originalmente se propuso.

VIII. Conclusiones

- ❖ La MIC es diferente en *Salmonella enterica* que en *Salmonella typhi*.
- ❖ Las bacterias que se encuentran en medio selectivo presentan un crecimiento más lento con relación al medio sin selector
- ❖ El porcentaje de supervivencia de las células es inversamente proporcional, a la concentración del pesticida.

- ❖ Contrario a lo esperado, la exposición a pesticida y después de salir de un estado de persistencia, el plásmido se conserva estable.
- ❖ No se observaron variaciones fenotípicas debido a que se encontró crecimiento en la mayoría de los medios con selectores.
- ❖ Ya que la cepa proviene de un origen nosocomial, el resultado de este estudio sería un posible escenario de lo que sucede en el medio natural, en cuanto a interacciones plásmido-bacteria.
- ❖ En un medio de cultivo con tetraciclina y estreptomicina, se sugiere que la respuesta a ambos antibióticos interfiere con la poza de ATP, NADH y por lo tanto, con la bomba de eflujo.
- ❖ Una perspectiva más amplia sobre la persistencia podría ser una nueva herramienta en la lucha contra bacterias patógenas, lo cual podría ayudar a desarrollar una terapia alternativa a futuro.
- ❖ Explorar las interacciones entre pesticidas y bacterias proporciona una nueva comprensión para la investigación asociada con genes de resistencia microbiana.

IX. Perspectivas

- Secuenciación de las cepas y plásmido previo a la exposición.
- Secuenciación de las cepas y el plásmido posterior a la exposición para dar seguimiento a las posibles mutaciones, y/o rearrreglos cromosomales.
- Determinar el número de copias de plásmidos mediante PCR en tiempo real antes y después de la exposición, utilizando oligonucleótidos específicos para secuencias cromosómicas y plásmidos.
- Determinar si existen factores externos u otras interacciones que modifiquen previamente las características del plásmido.
- Comparar el comportamiento de hospederos y plásmidos que presenten interacciones en comunidades microbianas *versus* los que no mantengan relación.
- Calcular la permeabilidad de la membrana previo y posterior a la exposición al pesticida.

Referencias

1. Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). Plasmids. En *Molecular Biology* (pp. 712–748). Elsevier.
2. San Millan, A. (2018). Evolution of Plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context. *Trends in Microbiology*, 26(12), 978–985. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.007>
3. Dionisio, F., Zilhão, R., & Gama, J. A. (2019). Interactions between plasmids and other mobile genetic elements affect their transmission and persistence. *Plasmid*, 102, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2019.01.003>
4. Zwanzig, M. (2021). The ecology of plasmid-coded antibiotic resistance: a basic framework for experimental research and modeling. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 586–599. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.0>
5. San Millan, A., & MacLean, R. C. (2017). Fitness costs of plasmids: A limit to Plasmid transmission. *Microbiology Spectrum*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0016-2017>
6. Domingues, C. P. F., Rebelo, J. S., Monteiro, F., Nogueira, T., & Dionisio, F. (2022). Harmful behaviour through plasmid transfer: a successful evolutionary strategy of bacteria harbouring conjugative plasmids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 377(1842). <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0473>
7. Ayala Sanmartin, Jesus. (1986). "Estabilidad de plasmidos tipo col E 1 en Escherichia coli K 12". (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/77741>
8. Wein, T., Hülter, N.F., Mizrahi, I. *et al.* Emergence of plasmid stability under non-selective conditions maintains antibiotic resistance. *Nat Commun* **10**, 2595 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10600-7>
9. Wein, T., & Dagan, T. (2020). Plasmid evolution. *Current Biology: CB*, 30(19), R1158–R1163. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.07.003>

10. Takashima, A., Kawano, H., Ueda, T., Suzuki-Minakuchi, C., Okada, K., & Nojiri, H. (2022). A toxin–antitoxin system confers stability to the IncP-7 plasmid pCAR1. *Gene*, 812(146068), 146068. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146068>
11. Munguia Zamudio, Maria Elena. (1987). "Estudios sobre estabilidad y replicación inducible en plásmidos tipo col el". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/183775>
12. Bahl M.I., Hansen L.H., Sørensen S.J. (2009) Persistence Mechanisms of Conjugative Plasmids. In: Gogarten M.B., Gogarten J.P., Olendzenski L.C. (eds) Horizontal Gene Transfer. *Methods in Molecular Biology*, vol 532. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9_5
13. Algarni, S., Ricke, S. C., Foley, S. L., & Han, J. (2022). The dynamics of the antimicrobial resistance mobilome of *Salmonella enterica* and related Enteric bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13, 859854. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.859854>
14. Barreto, M., Castillo-Ruiz, M., & Retamal, P. (2016). *Salmonella enterica*: a review or the trilogy agent, host and environment and its importance in Chile. *Revista chilena de infectologia: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*, 33(5), 547–557. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000500010>
15. Gómez, O. G. (2000). Vacuna atenuada de *Salmonella* como vector de antígenos heterólogos. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 20(2), 131. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v20i2.1056>
16. Mendoza-Medellín, A., Curiel-Quesada, E., & Camacho-Carranza, R. (2004). *Escherichia coli* R-factors unstable in *Salmonella typhi* are deleted before being segregated in this host. *Plasmid*, 51(2), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2003.10.002>
17. Klümper, U., Dechesne, A., Riber, L. *et al.* Metal stressors consistently modulate bacterial conjugal plasmid uptake potential in a phylogenetically conserved manner. *ISME J* **11**, 152–165 (2017). <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.98>

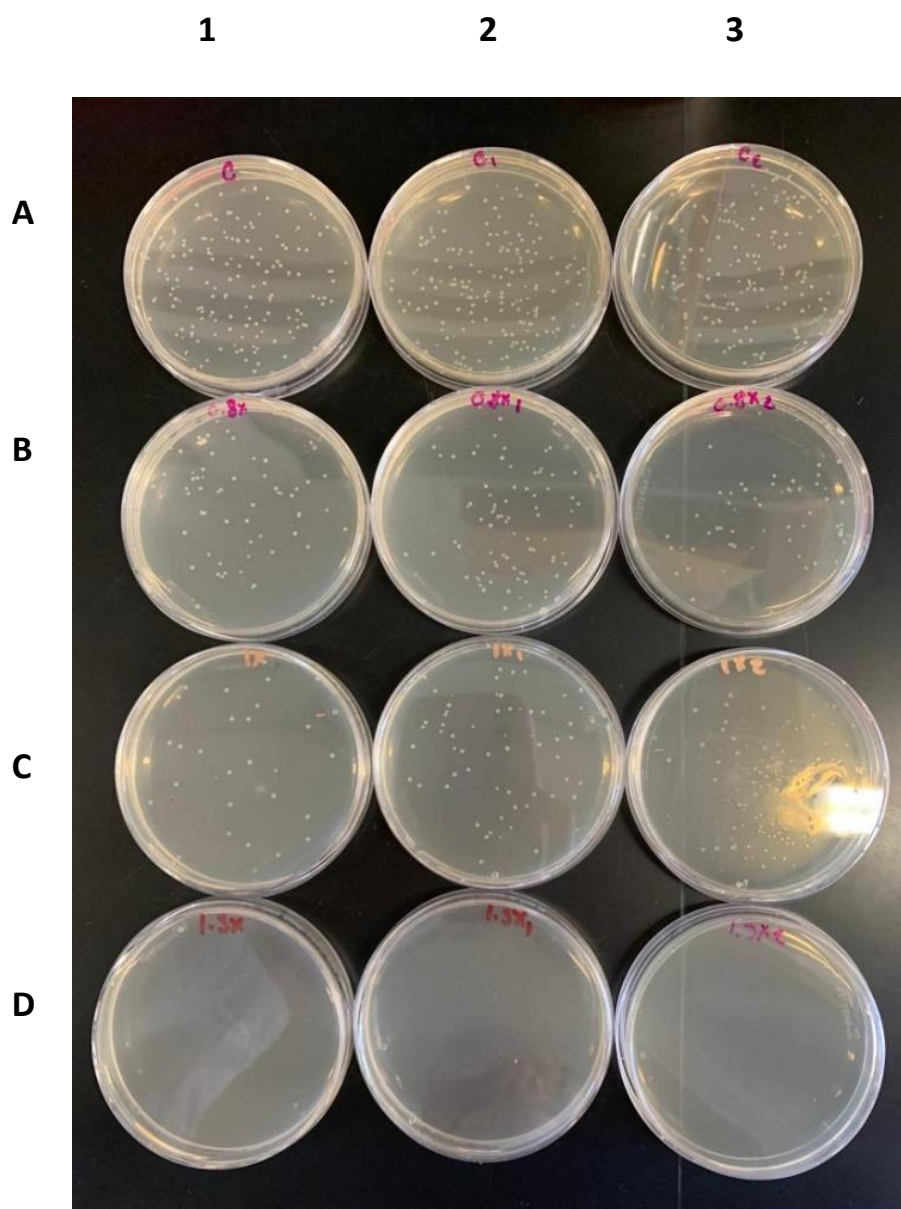
18. Silva, F., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2012). Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 30(3), 691–708. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.12.005>
19. Cirz, R. T., & Romesberg, F. E. (2007). Controlling mutation: Intervening in evolution as a therapeutic strategy. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(5), 341–354. <https://doi.org/10.1080/10409230701597741>
20. Merrikh, H., & Kohli, R. M. (2020). Targeting evolution to inhibit antibiotic resistance. *The FEBS Journal*, 287(20), 4341–4353. <https://doi.org/10.1111/febs.15370>
21. 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(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00009-15>
22. Liao, H., Li, X., Yang, Q., Bai, Y., Cui, P., Wen, C., Liu, C., Chen, Z., Tang, J., Che, J., Yu, Z., Geisen, S., Zhou, S., Friman, V.-P., & Zhu, Y.-G. (2021). Herbicide selection promotes antibiotic resistance in soil microbiomes. *Molecular Biology and Evolution*, 38(6), 2337–2350. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab029>
23. PubChem. (n.d.). *Methyl parathion*. Nih.gov. Retrieved November 17, 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl-parathion>
24. Mella M., S., Sepúlveda A., M., González R., G., BelloT., H., Domínguez Y., M., Zemelman Z., R., & Ramírez G., C. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 21(4), 330–338. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182004000400007>
25. Rivera Ramírez Xanthia Olinska. (2016). “Búsqueda de resistencia cruzada entre antibióticos y plaguicidas de uso agrícola en *Salmonella enterica*” (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.

26. Rivera Ramírez Xanthia Olinska. (2018). “Búsqueda de mecanismos de resistencia bacterianos concomitantes a pesticidas y antibióticos” (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
27. Suclupe-Campos, D.-O., Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Laboratorio de Microbiología. Lambayeque, Perú, Aguilar-Gamboa, F.-R., & Hospital Regional Lambayeque, Dirección de Investigación, Laboratorio de Inmunología y virología. Chiclayo, Perú. (2020). Persistencia bacteriana: un fenotipo celular de importancia clínica en infecciones crónicas y recurrentes. *Horizonte Médico*, 20(1), 77–87. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2020.v20n1.1>
28. Mendoza-Medellín, A., Camacho-Carranza, R., & Curiel-Quesada, E. (2012). Instability of *Escherichia coli* R-factors in *Salmonella enterica* serovar Typhi involves formation of recombinant composite plasmid structures. *Plasmid*, 68(2), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.04.004>
29. Sheppard, R. J., Beddis, A. E., & Barraclough, T. G. (2020). The role of hosts, plasmids and environment in determining plasmid transfer rates: A meta-analysis. *Plasmid*, 108(102489), 102489. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2020.102489>
30. Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). p. A2.6. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
31. Chen, S., Larsson, M., Robinson, R.C. *et al.* (2017). Direct and convenient measurement of plasmid stability in lab and clinical isolates of *E. coli*. *Sci Rep* 7, 4788. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05219-x>
32. Hall, J. P. J., Wright, R. C. T., Harrison, E., Muddiman, K. J., Wood, A. J., Paterson, S., & Brockhurst, M. A. (2021). Plasmid fitness costs are caused by specific genetic conflicts enabling resolution by compensatory mutation. *PLoS Biology*, 19(10), e3001225. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001225>
33. Qiu, D., Ke, M., Zhang, Q., Zhang, F., Lu, T., Sun, L., & Qian, H. (2022). Response of microbial antibiotic resistance to pesticides: An emerging health threat. *The Science of the Total Environment*, 850(158057), 158057. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158057>

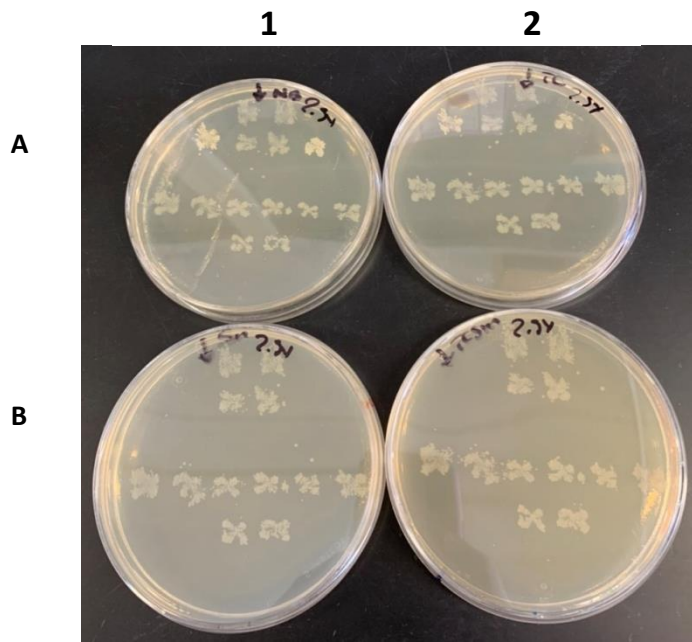
34. Alvo, A., V., Téllez G, V., Sedano M, C., & Fica C, A. (2016). Conceptos básicos para el uso racional de antibióticos en otorrinolaringología. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 76(1), 136–147. <https://doi.org/10.4067/s0718-48162016000100019>
35. Veitía Velázquez, J., Salgado de Velázquez, J., & Valery Márquez, F. (2008). Combinación de antibióticos en pediatría. *Archivos venezolanos de puericultura y pediatría*, 71(3), 96–102. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06492008000300007
36. Lopatkin, A.J., Meredith, H.R., Srimani, J.K. *et al.* Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. *Nat Commun* **8**, 1689 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01532-1>
37. Friehs, K. (2004). Plasmid copy number and plasmid stability. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 86, 47–82. <https://doi.org/10.1007/b12440>
38. Wang, Y., Yu, Z., Ding, P. *et al.* Non-antibiotic pharmaceuticals promote conjugative plasmid transfer at a community-wide level. *Microbiome* 10, 124 (2022). <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01314-y>
39. Jordt, H., Stalder, T., Kosterlitz, O. *et al.* Coevolution of host–plasmid pairs facilitates the emergence of novel multidrug resistance. *Nat Ecol Evol* **4**, 863–869 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1170-1>
40. Zwanzig, M., Harrison, E., Brockhurst, M. A., Hall, J. P. J., Berendonk, T. U., & Berger, U. (2019). Mobile compensatory mutations promote Plasmid survival. *MSystems*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/msystems.00186-18>
41. Hall, J. P. J., Brockhurst, M. A., Dytham, C., & Harrison, E. (2017). The evolution of plasmid stability: Are infectious transmission and compensatory evolution competing evolutionary trajectories? *Plasmid*, 91, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.04.003>
42. Navarro, J. R. (s/f). Diversidad plasmídica en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*: Comparación entre aislados comensales y clínicos. Tdx.cat. Recuperado el 8 de marzo de 2022, de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/671304/jrn1de1.pdf?sequence=1>

43. Billane, K., Harrison, E., Cameron, D., & Brockhurst, M. A. (2022). Why do plasmids manipulate the expression of bacterial phenotypes? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 377(1842). <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0461>
44. Rodríguez-Beltrán, J., DelaFuente, J., León-Sampedro, R., MacLean, R. C., & San Millán, Á. (2021). Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(6), 347–359. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00497-1>
45. Chukwudi, C. U., & Good, L. (2015). The role of the hok/sok locus in bacterial response to stressful growth conditions. *Microbial Pathogenesis*, 79, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.01.009>
46. Morejón García, M., Salup Díaz, R., & Cué Brugueras, M. (2003). Actualización en tetraciclinas. *Revista cubana de farmacia*, 37(3), 1–1. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152003000300008
47. Ashenafi, M., Ammosova, T., Nekhai, S., & Byrnes, W. M. (2014). Purification and characterization of aminoglycoside phosphotransferase APH(6)-Id, a streptomycin-inactivating enzyme. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 387(1–2), 207–216. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1886-1>
48. Ghodke, H., Paudel, B. P., Lewis, J. S., Jergic, S., Gopal, K., Romero, Z. J., Wood, E. A., Woodgate, R., Cox, M. M., & van Oijen, A. M. (2019). Spatial and temporal organization of RecA in the *Escherichia coli* DNA-damage response. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.42761>
49. Fisher, R. A., Gollan, B., & Helaine, S. (2017). Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews. Microbiology*, 15(8), 453–464. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>
50. Bochner, B. R., Huang, H. C., Schieven, G. L., & Ames, B. N. (1980). Positive selection for loss of tetracycline resistance. *Journal of Bacteriology*, 143(2), 926–933. <https://doi.org/10.1128/jb.143.2.926-933.1980>

Anexos



Anexo 1. Test de Concentración mínima inhibitoria para *S. typhi* para pesticida metil paratión. A (control sin estrés), B (0.3267 mg/ml), C (0.4084 mg/ml), D (0.6127 mg/ml).



Anexo 2. Se muestra el experimento a menor escala donde se realizó una master plate de 12 parches, observando la integridad de éstos en los medios con todos los selectores. A1 (NB), A2 (NB+Tc), B1 (NB+Sm), B2 (NB+Tc+Sm).