



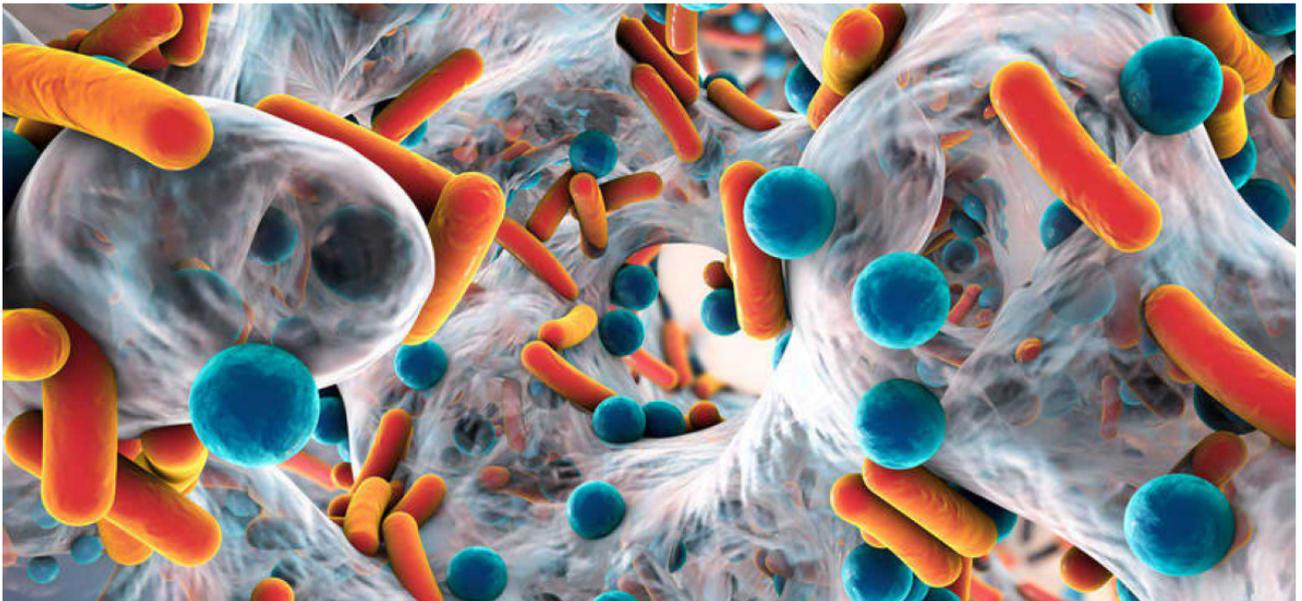
FACULTAD DE  
CIENCIAS

# Microbiología clínica

Grado en Bioquímica  
Departamento de Biología Molecular  
JMRR-UAM © 2020

## TEMA 9

### INTRODUCCIÓN A LA BACTERIOLOGÍA CLÍNICA



**María Margarita Balsells**  
**Andrea de Castro**  
**Irene Díaz**  
**Sara Marcos**  
**Pablo Moreno**  
**Irene Ranz**  
**Javier Sanz**  
**Lucía Vázquez**

## Contenido

INTRODUCCIÓN .....	4
1. CONCEPTOS Y DEFINICIONES.....	4
1.1. Infección .....	4
- 1.1.1. Colonización:.....	4
- 1.1.2. Infección inaparente:.....	4
- 1.1.3. Enfermedad infecciosa.....	5
1.2. Epidemiología y su terminología.....	5
2. PATOGENICIDAD.....	6
2.1. Determinantes extracromosomales de patogenicidad.....	8
2.2. Genes antivirulencia .....	9
3. ESTRATEGIAS PARA UNA ADAPTACIÓN MICROAMBIENTAL RÁPIDA: VARIACIÓN GENÉTICA FRENTE A REGULACIÓN GÉNICA .....	11
4. DIAGNÓSTICO .....	12
4.1. Aplicación de las nuevas tecnologías al diagnóstico en el laboratorio de microbiología clínica .....	13
4.1.1. Métodos de diagnóstico basados en la amplificación específica de secuencias .....	14
4.1.2. Métodos de diagnóstico basados en “microarrays” .....	17
4.1.3. PCR digital.....	19
4.1.4. Métodos basados en la secuenciación masiva de ácidos nucleicos .....	21
4.1.5. Métodos basados en la espectrometría de masas .....	22
5. ANTIBIÓTICOS.....	24
5.1. Los antibióticos y el microbiota .....	27
5.2. Características generales de los antibióticos .....	31
5.3. Blancos para las principales clases de drogas antibacterianas .....	32
5.3.1. Biosíntesis de la pared celular .....	34
5.3.2. Síntesis de proteínas.....	35
5.3.3. Replicación y reparación del DNA.....	36
5.4. Estrategias de las bacterias para neutralizar la acción de los antibióticos .....	36
5.4.1. Bombeo hacia fuera de antibióticos .....	37
5.4.2. Destrucción del antibiótico.....	37
5.4.3. Introducción de cambios en la estructura de la molécula blanco .....	38
5.5. Desarrollo de nuevas drogas que eviten la resistencia.....	41
5.6. Origen y evolución de los genes de resistencia .....	43
5.7. Persistencia bacteriana como mecanismo de resistencia a antibióticos.....	44
5.8 El efecto Eagle.....	49
6. ALTERNATIVAS A LOS ANTIBIÓTICOS EN LA ERA DE LOS MICROBIOS RESISTENTES .....	51
7. LA PIROPTOSIS: MECANISMO DE DEFENSA FRENTE A LA INFECCIÓN .....	54
8. INMUNIDAD FRENTE A LOS PATÓGENOS A TRAVÉS DE LA LIMITACIÓN NUTRICIONAL.....	63

8.1 Hierro (Fe).....	64
8.1.1. Limitación de hierro ante infección .....	66
8.1.2. Mecanismos bacterianos de captura de hierro .....	69
8.2 Manganeso y Zinc .....	71
8.3 Cobre .....	73
9. RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA INMUNITARIO Y LA FLORA INTESTINAL .....	75
REFERENCIAS. ....	86

## INTRODUCCIÓN

Dentro del mundo microbiano, sólo unas pocas especies son patógenas. La mayoría de los microorganismos desempeñan actividades esenciales en la naturaleza y muchos están íntimamente asociados a plantas o animales mediante relaciones estables y beneficiosas.

Además, puede resultar difícil distinguir entre hospedador y microbio, como ilustra el hecho de que el cuerpo humano lo componen  $10^{13}$  células y entre  $10^{14}$  y  $10^{15}$  microbios. Y uno se puede preguntar, ¿qué somos eucariotas o procariontes? Quizás nosotros seamos las "patas" de una macrocolonia de bacterias.

Las interacciones entre los microbios y el hospedador son importantes para muchos aspectos de la fisiología del hospedador, desde la actividad metabólica a la homeostasis inmunitaria. Algunos de los microorganismos simbióticos producen moléculas que interfieren o inhiben el crecimiento de organismos patógenos.

El sistema inmunitario del hospedador desempeña un papel importante en la regulación de la simbiosis entre los microbios y el hospedador. Así, por ejemplo, el sistema inmunitario asociado al intestino cuenta con células y tejidos especializados que muestrean la población microbiana e inducen respuestas inmunitarias locales que van a confinar el crecimiento de microorganismos a determinadas zonas. Sin embargo, si el hospedador experimenta daños o los microorganismos se expanden a sitios estériles, entonces se va a producir una respuesta vigorosa que va a parar la infección.

## 1. CONCEPTOS Y DEFINICIONES

### 1.1. Infección

Se puede definir como "el establecimiento y multiplicación de bacterias en la superficie o en el interior del hospedador". En este sentido no representa más que el establecimiento de una relación hospedador-bacteria, que puede tener diversos grados:

- **1.1.1. Colonización:** Es el grado mínimo de infección, que comprende el establecimiento de bacterias en la piel o mucosas del huésped y su multiplicación, sin que existan pruebas de respuesta inmunológica del hospedador.
- **1.1.2. Infección inaparente:** En este caso, el establecimiento de la bacteria no va seguida de manifestaciones clínicas, pero induce en el hospedador una respuesta específica que puede ser demostrada por pruebas serológicas u otras. También se denomina "infección asintomática o subclínica".

La infección inaparente se presenta en general cuando el organismo hospedador es capaz de inducir una buena respuesta defensiva antes de que se alcance el número crítico de microorganismos necesarios para producir la enfermedad.

- **1.1.3. Enfermedad infecciosa.** Cuando, además, se producen alteraciones más o menos graves en el hospedador, que se manifiestan por diversos síntomas clínicos.

Después de la recuperación de infección, el microorganismo puede continuar su multiplicación en grado suficiente para persistir en el organismo y aun ser eliminado al exterior; es el estado de "portador".

## 1.2. Epidemiología y su terminología

El estudio de la incidencia, distribución y control de las enfermedades en las poblaciones, es el campo de la epidemiología. Al igual que esta ciencia, su terminología es aplicable a las enfermedades ocasionadas por todo tipo de agente infeccioso.

- La tasa de prevalencia refleja la proporción total de individuos infectados (nuevos y antiguos) en una población en un momento dado. No tiene dimensiones y su valor oscila entre 0 y 1.
- La prevalencia no debe confundirse con la incidencia. La incidencia es una medida del número de casos nuevos de una enfermedad en un periodo de tiempo determinado.
- La tasa de morbilidad refleja el número de individuos que enferman de un tipo de infección del total de una población durante un período específico de tiempo, normalmente se refiere a un periodo anual.
- La tasa de mortalidad es la relación entre el número de muertes causadas por una enfermedad y el número total de casos de esa infección o enfermedad.
- Conceptos de epidemia, pandemia y endemia:
  - o Se dice que la enfermedad es epidémica cuando ocurre a un mismo tiempo en un número inhabitualmente alto de individuos de una comunidad;
  - o una pandemia es una epidemia ampliamente distribuida.
  - o Una enfermedad endémica es aquella que está continuamente presente en una población, pero con poca incidencia.
- Los reservorios son sitios en los que los agentes infecciosos permanecen vivos y viables, y a partir de los cuales puede surgir la infección de los individuos. Los reservorios pueden ser tanto animados como inanimados.

- Una enfermedad que ocurre principalmente en animales, pero que ocasionalmente se transmite a las personas se denomina zoonosis.

## 2. PATOGENICIDAD

Los microorganismos se han dividido tradicionalmente en dos grandes grupos, patógenos y no patógenos, según fueran capaces o no de producir una enfermedad. Los patógenos a su vez se han diferenciado en patógenos verdaderos o estrictos y patógenos potenciales u oportunistas:

- Entre los patógenos verdaderos o estrictos se encuentran *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Brucella*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Vibrio cholerae*.
- Los patógenos potenciales u oportunistas son aquellos capaces de colonizar al organismo y producir enfermedad sólo cuando se modifican las condiciones normales del hospedador y se produce un aumento de susceptibilidad. Los más importantes se encuentran en el grupo de los bacilos gramnegativos (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas*), cocos grampositivos (*Staphylococcus*, *Streptococcus* del grupo D), anaerobios (*Bacteroides*) e incluso virus (*Herpesviridae*), protozoos y hongos (*Candida*).

Por otra parte, las bacterias patógenas pueden dividirse en (**Fig. 1**):

- 1) **Bacterias extracelulares**, se multiplican en los espacios intercelulares. Sólo pueden producir la infección si elaboran sustancias o presentan mecanismos que inhiban la fagocitosis o el hospedador presenta deficiencias en su sistema fagocitario (*Staphylococcus*, *Neisseria*, *Bacillus*, *Clostridium*).
- 2) **Bacterias intracelulares facultativas**, se multiplican en el medio extracelular y, si se produce la fagocitosis, presentan mecanismos que interfieren con los procesos de digestión intracelular y pueden permanecer viables durante mucho tiempo en el interior del fagocito (*Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella*, *Listeria*).
- 3) **Bacterias intracelulares obligadas o estrictas**, sólo se pueden multiplicar en el interior de las células que les suministran la energía y parte de los mecanismos de biosíntesis (*Mycobacterium leprae*, *Rickettsia*, *Chlamydia*).

## TIPOS DE BACTERIAS

### EXTRACELULARES:

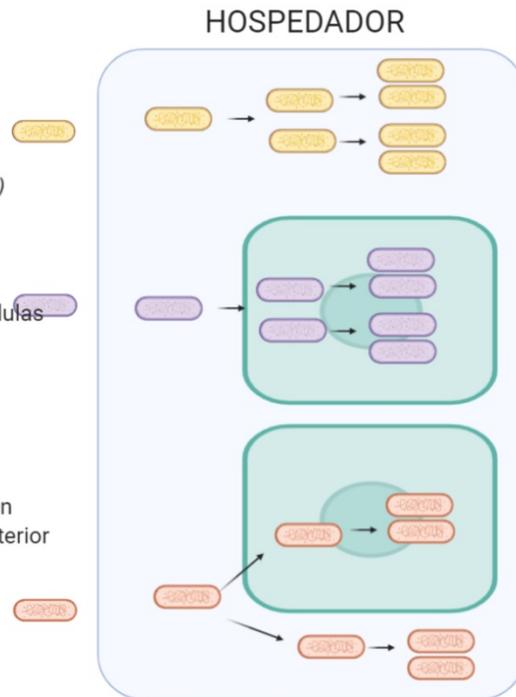
se multiplican en espacios intercelulares  
(*Staphylococcus, Neisseria, Bacillus, Clostridium*)

### INTRACELULARES Estrictas:

sólo se pueden multiplicar en el interior de las células  
(*Mycobacterium leprae, Rickettsia, Chlamydia*)

### INTRACELULARES FACULTATIVAS:

se multiplican en el medio extracelular, pero si son fagocitadas, pueden permanecer viables en el interior del fagocito  
(*Mycobacterium tuberculosis, Brucella, Listeria*)



**Figura 1. Tipos de bacterias clasificadas según su lugar de multiplicación.** Creada con BioRender

Estas tres categorías son importantes porque de ellas depende en gran parte la patogenia, diagnóstico y terapéutica de la enfermedad infecciosa correspondiente. En general, las bacterias intracelulares se caracterizan por producir con mayor frecuencia infecciones persistentes, ya sean crónicas, latentes o lentas, por intervenir de manera preponderante factores de inmunidad celular y porque en esta situación los microorganismos se encuentran protegidos y son más resistentes a los anticuerpos y también a los agentes antimicrobianos.

Las bacterias para poder manifestar su acción patógena deben ser capaces de:

- 1) Llegar a la superficie del huésped, colonizar el epitelio y resistir la acción de los sistemas locales de defensa: capacidad de colonización.
- 2) Atravesar la barrera cutaneomucosa para alcanzar los tejidos subepiteliales: capacidad de penetración.
- 3) Multiplicarse en los tejidos del hospedador, interfiriendo con los mecanismos defensivos humorales y celulares del medio interno: capacidad de multiplicación y de invasión.
- 4) Producir alteraciones y lesiones en las células y tejidos del hospedador, responsables del cuadro patológico: capacidad lesional.

## 2.1. Determinantes extracromosomales de patogenicidad

La mayoría de los determinantes de virulencia se encuentran en agrupaciones génicas cromosomales (islas de patogenicidad) o en elementos genéticos móviles extracromosomales como son los plásmidos, los transposones y los fagos. Esto sugiere que la evolución desde una forma de vida avirulenta a la patogénica frecuentemente implica la adquisición de fragmentos de DNA exógenos a través de procesos de transferencia génica horizontal. Lo que resulta más difícil de explicar es el origen de estos determinantes de virulencia, dado que ancestros de las bacterias patogénicas que contengan tales agrupaciones génicas no se han encontrado.

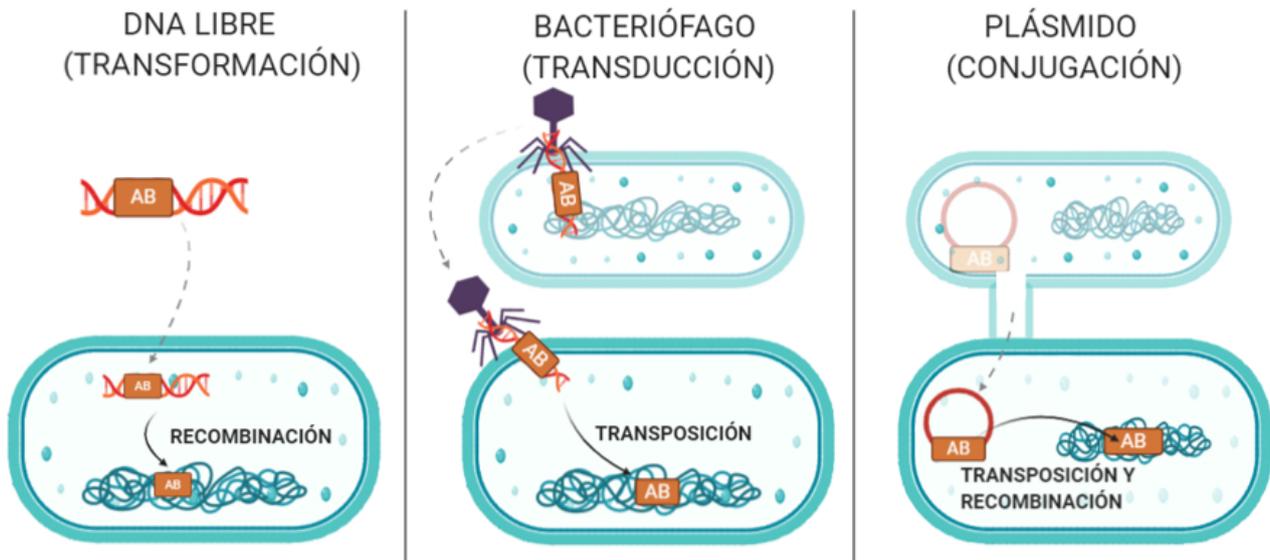
Se ha propuesto que estas islas de patogenicidad han podido tener su origen en procesos tales como:

- biodegradación (descomposición de organismos muertos),
- muerte de células vivas (competición con otros organismos para obtener alimentos)
- adaptación para vivir dentro de células eucarióticas (tales como amebas, protozoos, plantas y animales) en ambientes naturales.

Así los determinantes de virulencia podrían desempeñar papeles diferentes en los organismos originarios desde los que fueron transferidos a las bacterias patogénicas. Sin embargo, una vez que esos determinantes se han fijado en la bacteria receptora por conferir alguna ventaja, éstos podrían evolucionar adicionalmente y eventualmente ser transferidos a otras especies bacterianas.

Un caso particular de factores de virulencia puede considerarse los genes de resistencia a antibióticos. Aunque nos referiremos más adelante a ellos, una característica de los mismos es que pueden ser transferidos entre especies, géneros e incluso reinos. En este sentido, con frecuencia, los genes de resistencia se suelen encontrar agrupados en integrones (plásmidos, transposones, agrupaciones genómicas) que son fácilmente movilizables. Además, las bacterias, particularmente, tienen una gran capacidad de movilizar genes a través de diversos mecanismos (**Fig. 2**):

- transformación (captura de DNA presente en el medio)
- transducción mediada por fagos
- conjugación (intercambio de DNA entre organismos).



**Figura 2. Mecanismos de adquisición de genes de resistencia.** AB – gen de resistencia a antibiótico. *Creada con BioRender*

## 2.2. Genes antivirulencia

La emergencia de nuevos patógenos o la explotación de nuevos nichos por bacterias patógenas con frecuencia ocurre como resultado de una transferencia horizontal de factores de virulencia, que es seguida por un proceso de adaptación que conduce a una incorporación de esos factores al genoma del microbio. La función de estos nuevos factores de virulencia puede quedar oculta por la expresión de genes ya presentes en la bacteria. En ocasiones, algunos genes deben ser inactivados o delecionados para una correcta expresión y función de los nuevos factores de virulencia. A estos genes se les conoce como genes antivirulencia (AVGs, “antivirulence genes”).

En el proceso evolutivo, la pérdida de genes puede ser tan importante para la supervivencia de un microorganismo como la adquisición de genes. De hecho, durante la adaptación bacteriana a nichos muy específicos, es muy frecuente que se produzcan mutaciones génicas que conllevan una pérdida de función. Cuando ciertos productos génicos o vías no son necesarios en este nuevo ambiente, se produce una acumulación de mutaciones en los genes prescindibles sin que esto afecte la viabilidad del microorganismo:

- En la primera etapa de esta evolución reduccionista, los organismos comienzan a acumular pseudogenes en vías metabólicas no necesarias, aunque siguen conservando la mayoría de los genes necesarios para una bacteria de vida libre.

- A continuación, en una etapa intermedia de esta evolución reduccionista, todos o la mayoría de los genes superfluos resultan inactivados, pero restos no funcionales de estos genes aún persisten. Esta fase intermedia de evolución reduccionista se observa en organismos adaptados a nichos específicos tales como *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, y *Yersinia pestis*, quienes poseen una gran proporción de pseudogenes.
- Con el tiempo, las regiones que ya solo contienen genes no funcionales son eliminadas gradualmente de los genomas bacterianos. En esta etapa final de la evolución reduccionista, las bacterias poseen genomas considerablemente menores que sus predecesores y ya pocos pseudogenes, indicando que han alcanzado el final de su camino evolutivo.

Entre los organismos que han alcanzado esta etapa final se encuentran endosimbiontes y patógenos intracelulares obligados tales como *Buchnera*, *Mycobacterium leprae* y *Chlamydia trachomatis*, que se han adaptado para la obtención de nutrientes de sus hospedadores y han perdido, en consecuencia, numerosas vías biosintéticas.

#### Genes de antivirulencia y genes supresores

Una segunda vía evolutiva que conduce a la pérdida de genes también ocurre en patógenos microbianos. El concepto de pleiotropía antagonística indica que un gen cuya expresión es ventajosa en un determinado ambiente puede ser perjudicial en otro ambiente distinto. Como la virulencia es un factor crítico para la supervivencia continuada de un patógeno en el hospedador, la expresión de cualquier gen que interfiera con la virulencia va a ser perjudicial para la viabilidad del patógeno. Así, la adquisición de un nuevo factor de virulencia puede requerir de un proceso adaptativo en el que se eliminen genes cuyos productos interfieran con la función de este factor de virulencia. A estos genes que interfieren se les conoce como genes antivirulencia (AVGs), y se definen como aquellos genes cuya expresión en un patógeno es incompatible con la virulencia de ese patógeno. En consecuencia, un AVG debe ser inactivado, deletado o regulado de forma diferencial para impedir que su expresión interfiera con la virulencia del patógeno.

Existe una categoría de genes, distinta a los AVGs, conocidos como supresores, que son aquellos que una vez inactivados conducen a un aumento de virulencia, un fenómeno conocido como hipervirulencia.

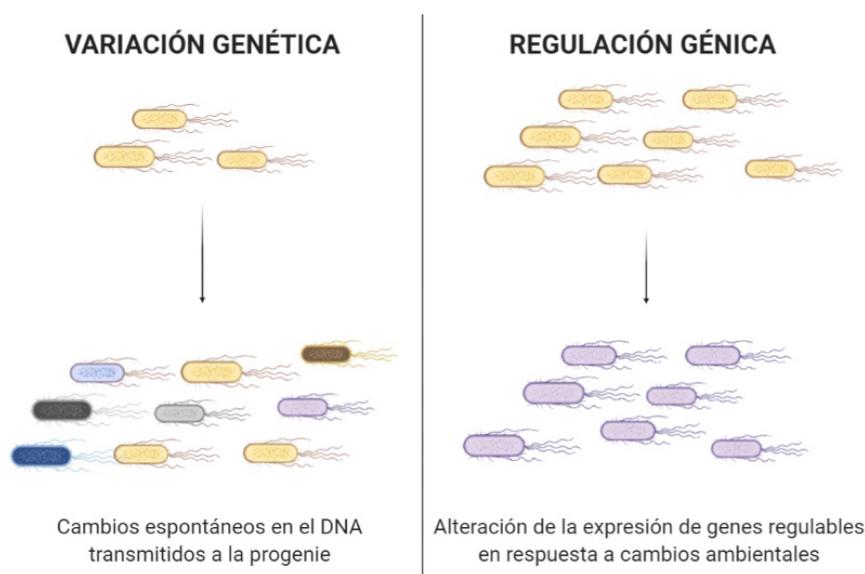
### 3. ESTRATEGIAS PARA UNA ADAPTACIÓN MICROAMBIENTAL RÁPIDA: VARIACIÓN GENÉTICA FRENTE A REGULACIÓN GÉNICA

Las poblaciones de microbios no sólo necesitan adaptarse a los cambios medioambientales a largo plazo que encuentran durante la coevolución con el hospedador sino, además, que encuentran frecuentes cambios microambientales recurrentes como, por ejemplo, durante el curso de la infección. Para responder a estos cambios recurrentes, los microorganismos mantienen dos tipos de programas genéticos adaptativos (**Fig. 3**):

- 1) La variación genética es debida a cambios espontáneos en el DNA que son transmitidos a la progenie y son a menudo reversibles. Como una consecuencia, esta variación genética genera poblaciones heterogéneas a partir de una cepa microbiana, de tal forma que alguna fracción de esta población es probable que muestre una adaptación mejorada al microambiente.
- 2) La segunda estrategia de adaptación, la regulación génica, influye sobre la población bacteriana en su conjunto. En respuesta a un determinado estímulo ambiental, tal como temperatura, osmolaridad, sustancias específicas, la bacteria altera la expresión de genes regulables.

Obviamente, las dos estrategias tienen ventajas específicas para los microorganismos. Mientras que la variación genética protege mejor a pequeñas fracciones de la población frente a una gran variedad de cambios impredecibles, la regulación génica afecta a un proceso adaptativo pre-determinado para el beneficio de la población entera.

La variación genética y la regulación génica no se excluyen, sino que con frecuencia se dan simultáneamente.



**Figura 3. Estrategias para una adaptación microambiental rápida: Variación genética frente a regulación génica. Creada en BioRender**

#### 4. DIAGNÓSTICO

En la **figura 4** se resumen los métodos clínicos y diagnósticos empleados más frecuentemente en el aislamiento e identificación de patógenos.

Esta labor es realizada por el microbiólogo clínico y su mayor preocupación es la de identificar los microorganismos presentes en las muestras clínicas lo más rápido posible. Estos especialistas también determinan la susceptibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos. La microbiología clínica ha incorporado distintos conocimientos procedentes de áreas tan diversas como la bioquímica microbiana, la inmunología, la biología molecular, etc.



**Figura 4. Métodos clínicos y diagnósticos empleados para el aislamiento e identificación de patógenos. Creada con Biorender.**

#### 4.1. Aplicación de las nuevas tecnologías al diagnóstico en el laboratorio de microbiología clínica

Los tremendos avances en las técnicas moleculares nos han traído la posibilidad de determinar de una forma relativamente sencilla (y económica) el contenido total de una célula, o de todo el organismo, de metabolitos (metabolómica), proteínas (proteómica), RNAs (transcriptómica) y genes (genómica). Estas tecnologías están revolucionando el campo del diagnóstico clínico en general y el de la microbiología clínica, en particular.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos ya supusieron una revolución en el campo del diagnóstico de enfermedades infecciosas. Actualmente existen pruebas basadas en la amplificación de secuencias para la mayoría de los agentes infecciosos más comunes. Estas metodologías permiten identificar la presencia de patógenos en muestras clínicas, aun cuando el agente infeccioso esté en cantidades muy pequeñas y con gran rapidez.

La principal ventaja sobre los métodos microbiológicos clásicos de que no es preciso aislar y crecer el agente infeccioso a partir de la muestra clínica. La limitación de estas técnicas basada en la amplificación de ácidos nucleicos es que sólo van a ser identificados aquellos agentes para los que se hayan diseñado oligonucleótidos específicos, pasando desapercibidos otros agentes infecciosos que pudieran estar presentes en las muestras clínicas. Esta limitación desaparece con el empleo de pruebas diagnósticas basadas en secuenciación masiva (NGS, "next-generation sequencing"), que permiten la simultánea identificación de todos los microorganismos que pudieran estar presentes en una muestra clínica, al tiempo que se obtiene una cuantificación fiable de los organismos presentes.

Las técnicas proteómicas basadas en la identificación mediante espectrometría de masas del perfil proteómico de un microorganismo también resultan de gran utilidad en el diagnóstico microbiológico clásico. En cuanto que una vez que un microorganismo es crecido de forma aislada, este tipo de análisis evita la necesidad de hacer pruebas selectivas de crecimiento para llegar a la identificación fiable de la naturaleza de un determinado microorganismo.

No obstante, no deberíamos caer en el error de ignorar los métodos diagnósticos clásicos, y sus fundamentos, y educar a los nuevos técnicos en diagnóstico solamente en el empleo de las técnicas moleculares, sino que resulta fundamental mantener el conocimiento de las técnicas clásicas para tener una visión más completa que ayudará a un mejor diagnóstico y valoración de la peligrosidad del agente infeccioso.

Los métodos moleculares de diagnóstico reducen el tiempo para obtener resultados y normalmente va a dar un diagnóstico más certero. No obstante, a pesar de estas ventajas, los métodos moleculares también tienen

sus problemas. Por ejemplo, los métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos o su detección por otros métodos moleculares, lo que nos están confirmando es la existencia del ácido nucleico, pero no son una prueba de la presencia de organismos viables. Otro problema potencial es la interpretación de los resultados positivos obtenidos en pacientes asintomáticos o de aquellos que han recibido una terapia apropiada.

En resumen, en estos ensayos, cualquier cantidad de ácidos nucleicos detectados en una muestra es reportada como positiva, independientemente de si representa un proceso infeccioso debido a un organismo vivo, bajo nivel de colonización o infección asintomático, o incluso la presencia de ácidos nucleicos libres en ausencia de un organismo viable. Por ejemplo, las técnicas de detección de ácidos nucleicos son positivas en más del 50% de los pacientes, cuatro semanas después de haber seguido un tratamiento apropiado para combatir la infección con *Clostridium difficile*. Por tanto, es muy útil tener en cuenta los síntomas clínicos y los resultados de estos sistemas de diagnóstico antes de dictaminar un resultado positivo por un test basado en la amplificación de ácidos nucleicos.

A continuación, se describen los fundamentos de estas nuevas técnicas de diagnóstico.

#### 4.1.1. Métodos de diagnóstico basados en la amplificación específica de secuencias

##### → PCR

La amplificación de ácidos nucleicos basados en la utilización de una polimerasa termoestable, PCR (Fig. 5), fue introducida en 1988 y desde entonces se viene aplicando no sólo en investigación, sino que es de gran utilidad en el diagnóstico molecular y en los laboratorios de microbiología clínica. Es una técnica que se caracteriza por una gran sensibilidad y especificidad, y es capaz de detectar la presencia de 1-10 copias de una molécula blanco. Además, en los laboratorios clínicos los procesos están altamente automatizados, lo que además disminuye grandemente la posibilidad de contaminación entre muestra, errores de pipeteo y otros errores preanalíticos atribuibles al error humano.

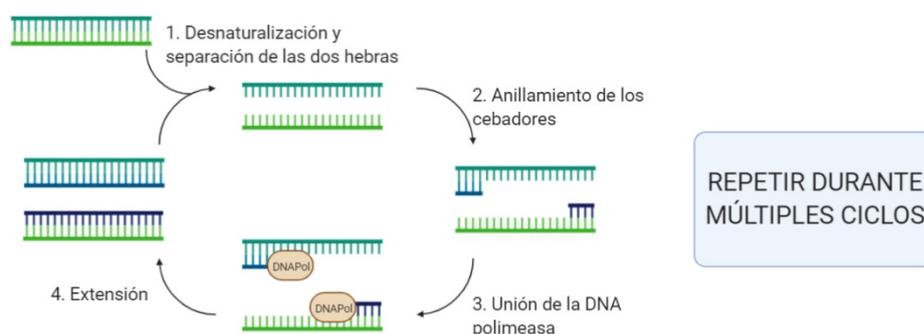


Figura 5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Creada con Biorender.

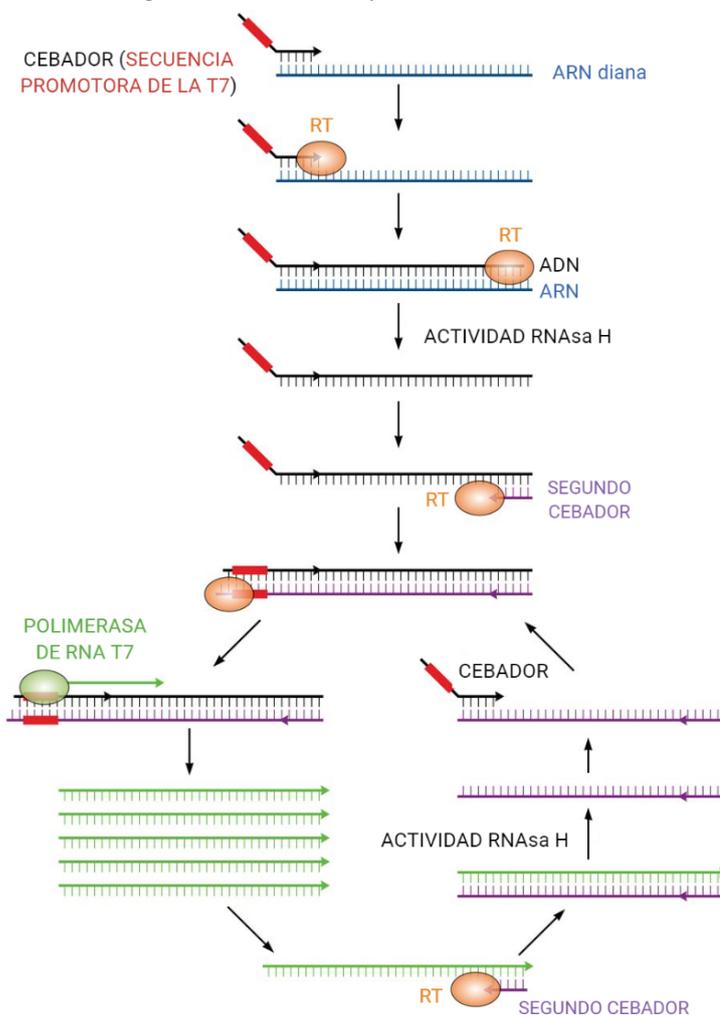
Sin embargo, la necesidad de un termociclador ha llevado a buscar alternativas metodológicas que no requieran de este aparato. A continuación, se describen tres de estos métodos que, por no requerir instrumental sofisticado, tienen gran utilidad en el “diagnóstico de campo”.

## → AMPLIFICACIÓN MEDIADA POR TRANSCRIPCIÓN

La amplificación mediada por transcripción (TMA, “transcription-mediated amplification”) difiere de la PCR convencional en que utiliza como blanco una molécula de RNA (mRNA o rRNA), que puede estar presente en un alto número de copias en la célula.

En la mezcla de reacción se incluye una transcriptasa reversa y la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Para la amplificación del molde se emplea un oligo que contiene la secuencia promotora de la polimerasa T7, de tal manera que luego el enzima es capaz de generar miles de copias de RNA a partir de las moléculas de cDNA que produce la retrotranscriptasa.

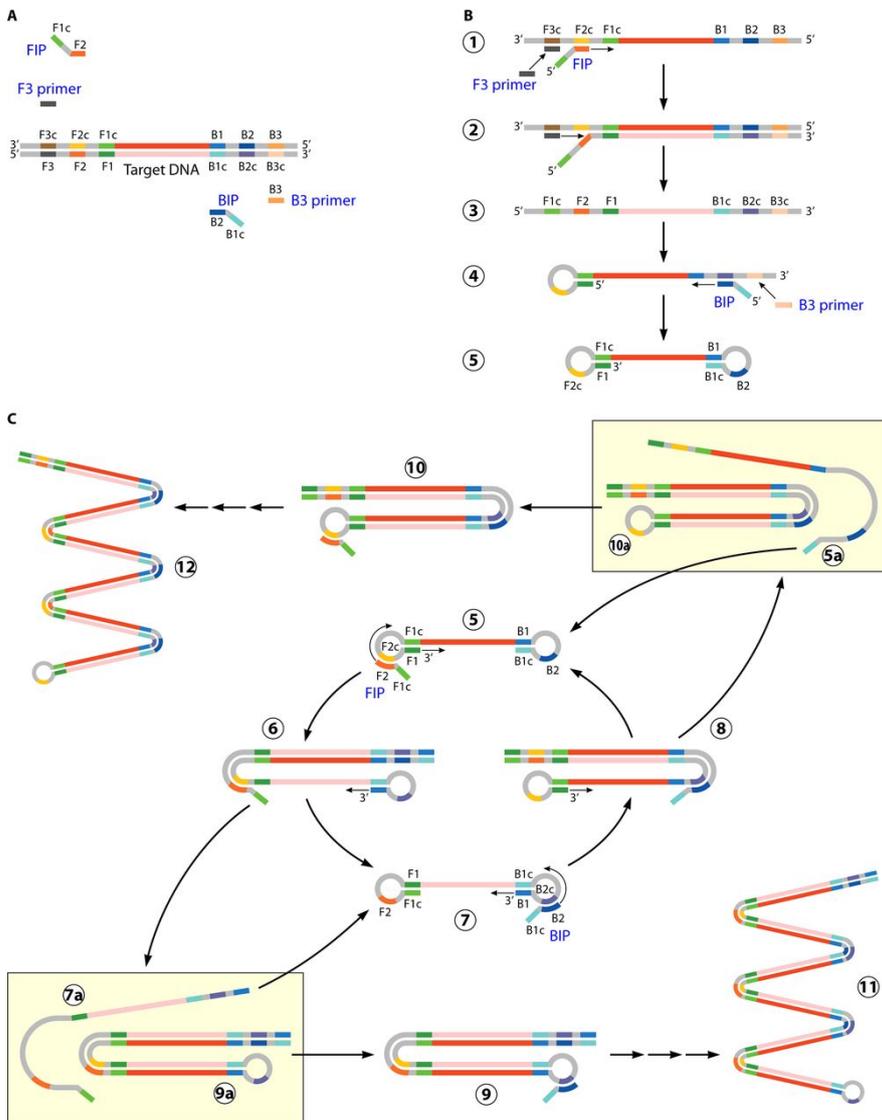
En la **figura 6** se ilustra el proceso:



**Figura 6. Amplificación mediada por transcripción (TMA).** Se parte de un ARN diana al que se une un cebador de ADN que contiene una secuencia promotora de ARN polimerasa T7 viral (recuadro rojo). La transcriptasa inversa (RT) extiende el cebador de ADN y se forma un dúplex de RNA-DNA. La actividad RNasa H degrada el RNA, quedando solo la cadena de ADN. Un segundo cebador hibrida con el ADN monocatenario (negro) y se extiende gracias a la RT, que incorpora el promotor T7 en la secuencia de ADN de doble cadena. A continuación, la polimerasa de ARN T7 reconoce dicha secuencia y sintetiza de 100 a 1000 copias de ARN de una sola hebra (verde). Estas copias serán diana de los cebadores, sirviendo como molde para las siguientes rondas de amplificación. *Modificada a partir de la figura en Bachun & Ledebor (2014).*

→ **AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR LAZO**

Un método que está alcanzando gran aceptación es la amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP, "loop-mediated isothermal amplification"). Esta técnica requiere de cuatro oligonucleótidos iniciadores y seis sitios de anillamiento en la molécula blanco. En menos de 1 hora se obtienen altos niveles de amplicones. La pareja de iniciadores internos comienza la amplificación, y a continuación la pareja de iniciadores externos inician una ronda de replicación que desplaza el producto inicial, regenerando el molde de cadena sencilla sin la necesidad de una desnaturalización térmica (Fig. 7). Al requerir cuatro iniciadores, esta técnica suele tener más especificidad que la PCR convencional, y, por tanto, se puede determinar de forma indirecta si la amplificación ha tenido lugar. Con frecuencia la amplificación se detecta visualmente por la aparición de turbidez como resultado de la precipitación de pirofosfato, generado por la incorporación de los nucleótidos durante la amplificación, con el ion magnesio presente en la mezcla de reacción.



**Figura 7. Amplificación isotérmica medida por bucle (LAMP).**

(A) Elementos necesarios: 4 cebadores complementarios a 6 regiones diferentes del ácido nucleico diana (F1, F2, F3, B1, B2 y B3). La FIP "cebadores internos" y BIP contienen cada uno dos regiones complementarias a la secuencia diana; se hibrida con la cadena molde (F2 y B2), y uno hibrida con la cadena complementaria (F1c y B1c). Los "cebadores externos" (F3 y B3) son complementarios a una única secuencia aguas arriba de FIP y BIP, respectivamente.

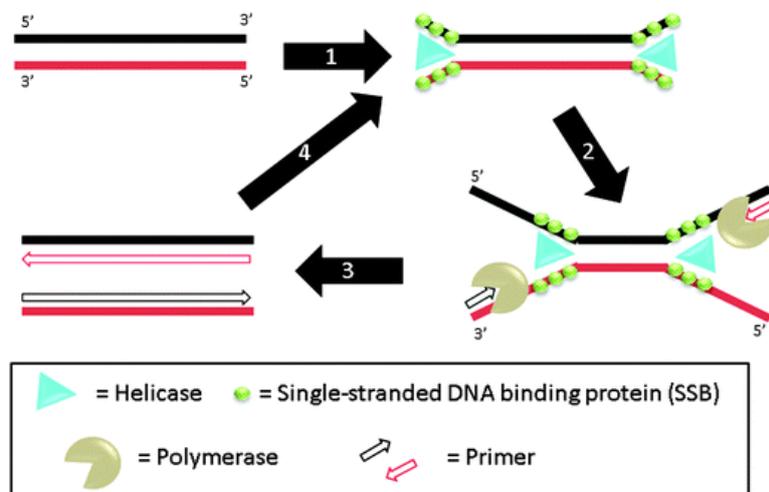
(B) La replicación inicia con el recocido y la extensión de los cebadores internos FIP y BIP. Las hebras desplazadas forman 5 estructuras de bucle a través de unión complementaria, lo que resulta en una estructura de una sola hebra "mancuerna".

(C) La hebra simple "pesa de gimnasia" sirve como la plantilla para las siguientes rondas de amplificación usando la FIP y los cebadores BIP para iniciar alargamiento. Molde de cadena sencilla se mantiene a través de la formación de estructuras de bucle que puede ampliarse para mostrar productos double strand nueva síntesis (C5 a C8). Modificada a partir de la figura en Buchan & Ledebor (2014).

## → AMPLIFICACIÓN DEPENDIENTE DE HELICASA

La amplificación dependiente de helicasa (HDA, “helicase-dependent amplification”) es otra técnica de amplificación isotérmica que puede emplearse para diagnóstico ambulatorio (incluso en ausencia de electricidad). Este método se basa en la utilización de las enzimas de *E. coli* UvrD (DNA helicasa) y MutL (una proteína que ayuda en la interacción de UvrD con el DNA), y de proteínas de unión a DNA de cadena sencilla (SSB, “single-strand binding proteins”) para crear y mantener un molde de cadena sencilla para el anillamiento del iniciador, favoreciendo las rondas de amplificación (**Fig. 8**).

El complejo UvrD/MutL desenrolla el DNA de cadena doble, y a continuación las proteínas SSB se van a encargar de impedir la asociación de las cadenas complementarias. La unión de los iniciadores a la molécula blanco va a permitir la extensión por la DNA polimerasa para generar una copia. El amplicón va a ser ahora desplegado por el complejo UvrD/MutL para permitir las siguientes rondas de amplificación. La potencia de esta técnica es tal que puede detectar la presencia de tan solo 6 copias del genoma del virus herpes simplex 1 (HSV-1) presentes en muestras orales o mucocutáneas, sin la necesidad de realizar una extracción previa de ácidos nucleicos y en tan solo 75 minutos.



**Figura 8. Amplificación dependiente de helicasa.** Durante el paso 1 la helicasa separa el ADN para generar regiones de cadena sencilla de ADN. Este proceso se apoya en la actividad de las proteínas SSB (Single Stranded DNA binding proteins) y otras proteínas accesorias. Los primers se pueden unir a las regiones de cadena sencilla y la polimerasa cataliza la amplificación en los pasos 2 y 3. Los nuevos fragmentos de doble cadena de ADN generados pueden volver a amplificarse por el mismo proceso. *Figura en Yan et al. (2014).*

### 4.1.2. Métodos de diagnóstico basados en “microarrays”

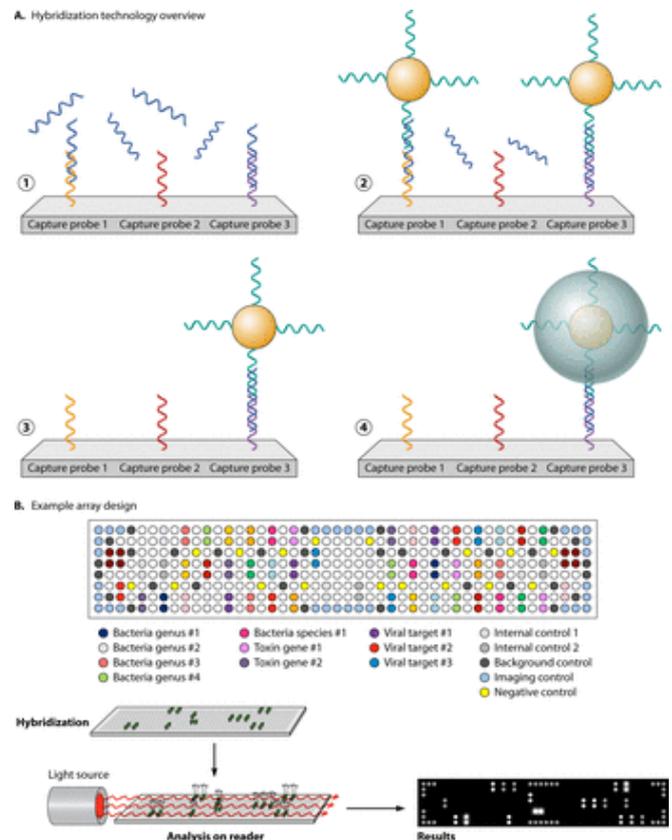
Estos métodos tienen el objetivo de detectar un gran número de blancos en el mismo ensayo de detección de ácidos nucleicos. Los ensayos de microarrays pueden dividirse a su vez en dos clases: los ordenamientos en

fase sólida, que se basan en la detección espacial de blancos ordenados sobre una superficie sólida; y los ordenamientos en fase líquida que utilizan sondas de captura específicas de blanco que están conjugadas a microesferas que son detectadas mediante citometría de flujo.

Un beneficio claro de estos métodos es que se pueden detectar simultáneamente un número grande de patógenos presentes en una muestra, sin la necesidad de aplicar diferentes metodologías y métodos específicos de cultivo para cada uno de los patógenos.

Los microarrays o microarreglos clásicos se basan en la utilización de oligonucleótidos sintéticos (sondas de captura) inmovilizados sobre una superficie sólida, que puede ser un portaobjetos de vidrio o una membrana de nitrocelulosa. El número de sondas de captura puede variar desde un centenar hasta más de un millón. Por lo general se incluyen varias sondas para cada microorganismo a diagnosticar para aumentar la especificidad. Un ejemplo de este sistema se muestra en la **figura 9**, que corresponde al sistema Verigen (Nanosphere, Northbrook, IL).

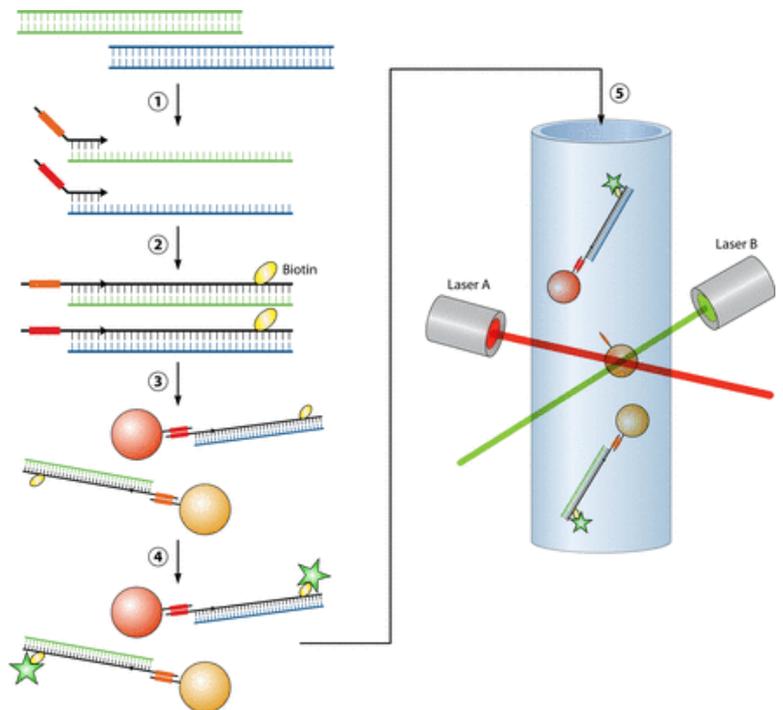
**Figura 9. Microarray en fase sólida de Verigen.** (A) Sondas específicas de cadena sencilla son ordenadas espacialmente e inmovilizadas en la superficie de un portaobjetos de cristal. La secuencia diana de estas sondas puede provenir de una amplificación por PCR o de ácidos nucleicos extraídos. Esta diana es desnaturizada y se aplica sobre el portaobjetos. Si en la muestra está la diana, ésta se anillará a su sonda específica. Las microesferas de oro, cubiertas con hebras sencillas de un ácido nucleico complementario a otra región de la secuencia diana, son añadidas y se unen al complejo sonda-secuencia diana. De esta forma, se crea un “sandwich” de ácidos nucleicos. La matriz se lava para eliminar todo aquello que no ha quedado retenido. Se aplica plata coloidal que aumenta los tamaños de las esferas para favorecer la sensibilidad de la detección. (B) Sondas de captura específicas, junto a controles internos, son colocados por triplicado en diferentes lugares del portaobjetos para asegurar la consistencia en los pasos del anillamiento e hibridación y aumentar la precisión de los resultados. La detección de la secuencia diana se lleva a cabo usando una fuente de luz que cruce el plano del array. Si están presentes las microesferas de plata unidas difractarán la luz, que será detectada por una cámara óptica en el lector. *Figura en Buchan & Ledebor (2014)*



Un ejemplo de la tecnología de microarrays en fase líquida es el sistema xTAG (Luminex, Toronto, Canada), que se ilustra en la **figura 10**. Este sistema consta de una etapa inicial de PCR en la que colocan un número alto de iniciadores específicos de blanco (una pareja para cada uno de los patógenos a diagnosticar). Un iniciador de cada pareja contiene una “etiqueta” característica, y en la mezcla de reacción hay nucleótidos marcados con biotina, que será incorporada al amplicón por la polimerasa.

A continuación, los amplicones “etiquetados” son incubados con microesferas con diferentes fluoróforos y con una secuencia complementaria a cada una de las “etiquetas” de los iniciadores. Finalmente se añade estreptavidina conjugada a un fluoróforo que se unirá a los amplicones marcados con biotina. Para la detección se emplean dos láseres que van a detectar, por un lado, la presencia del fluoróforo asociado a la estreptavidina y, por otro lado, el tipo de microesfera en función de la fluorescencia emitida por la misma. Así, por ejemplo, el test xTAG para agentes causantes de gastroenteritis está diseñado para detectar simultáneamente 15 blancos diferentes entre las bacterias, virus y protozoos más frecuentemente asociados con la gastroenteritis.

**Figura 10. Microarray en fase líquida xTAG.** Las secuencias diana (azul y verde) se amplifican utilizando una PCR multiplex. Tras la amplificación, un segundo conjunto de cebadores específicos contra la diana es usado para extender la copia de la secuencia diana. Estos contienen secuencias de etiqueta “universal” (recuadros naranja y rojo) únicos para cada primer. Durante dicha extensión, se incorpora un marcador de biotina en el amplicón. Los amplicones marcados, se incuban entonces con microperlas de poliestireno. Cada microperla tiene un color único, lo que permite la diferenciación de hasta 100 tipos diferentes por el analizador. Cada perla está recubierta con una sonda nucleotídica de cadena sencilla complementaria a una de las etiquetas de secuencias universales (antitag). Los amplicones etiquetados con una etiqueta de secuencia universal podrán hibridar con una microperla que contenga su antitag. Además, un fluorocromo conjugado con esteptavidina (estrella verde) se añade e hibrida con los amplicones unidos a biotina que están inmovilizados en las perlas. Siguiendo los pasos de la hibridación, las perlas son analizadas utilizando un cell sorter (citometría de flujo) equipado con 2 láseres. El primero detecta la presencia del fluoróforo conjugado con biotina, que indica la presencia de un amplicón unido a su microperla específica. El segundo láser se centra en la perla para determinar qué color está presente y de esta manera identificar la diana específica en el amplicón. En el ejemplo del paso 5, se puede ver cómo la perla central no está unida a un amplicón, por tanto, no será reconocida por el primer láser y entonces, no será analizada tampoco por el segundo. *Figura en Buchan & Ledebøer (2014)*



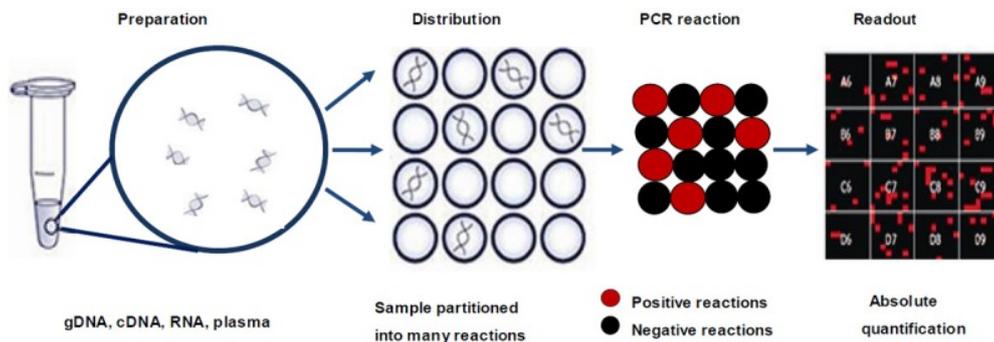
#### 4.1.3. PCR digital

La cuantificación de ácidos nucleicos en una muestra clínica utilizando RT-PCR (qPCR) es una técnica que está adquiriendo gran relevancia en los laboratorios de microbiología clínica y molecular. Así, la progresión de la enfermedad, el pronóstico, la selección de antivirales, y la respuesta a la terapia están asociados a la carga viral y a los cambios que esta experimenta durante las monitorizaciones del paciente.

La qPCR se basa en la determinación de la señal de fluorescencia generada tras cada ciclo de RT-PCR (real-time PCR). Su utilidad para la cuantificación se basa en el establecimiento de una señal umbral, que normalmente es el ciclo en el que la fluorescencia es 10 veces mayor a la desviación estándar del valor del fondo (control negativo), y en la utilización de una serie de puntos (curva estándar) que contienen cantidades conocidas del molde-blanco.

Sin embargo, esta técnica tiene el problema de que la señal umbral y la curva estándar deben ser generadas para un determinado aparato y que además requieren de una calibración regular para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

Estos problemas desaparecen con la técnica PCR digital (dPCR). Esta técnica está diseñada para determinar el número real de secuencias blanco-presentes en una muestra clínica. Esto se consigue mediante la dilución y segregación de la muestra en miles de mezclas de RT-PCR. La dilución de la muestra es tal que cada mezcla de reacción tendrá una o ninguna copia del molde. Siguiendo la RT-PCR de todas las mezclas, el número de pocillos donde se detecte una señal positiva corresponde al número de copias del molde que estaban presentes en la muestra (**Fig. 11**).



**Figura 11. Principios básicos de la PCR digital.** La muestra se divide en muchas particiones independientes de forma que cada una contenga una o ninguna secuencia de ADN. La distribución de las secuencias en cada partición se aproxima por una distribución de Poisson. Cada partición actúa como una PCR independiente, y en aquellas en que se produzca la amplificación esta misma se detecta por fluorescencia. De esta forma se independiza la cuantificación de la elaboración de curvas estándar. *Figura en Mao et al. (2019).*

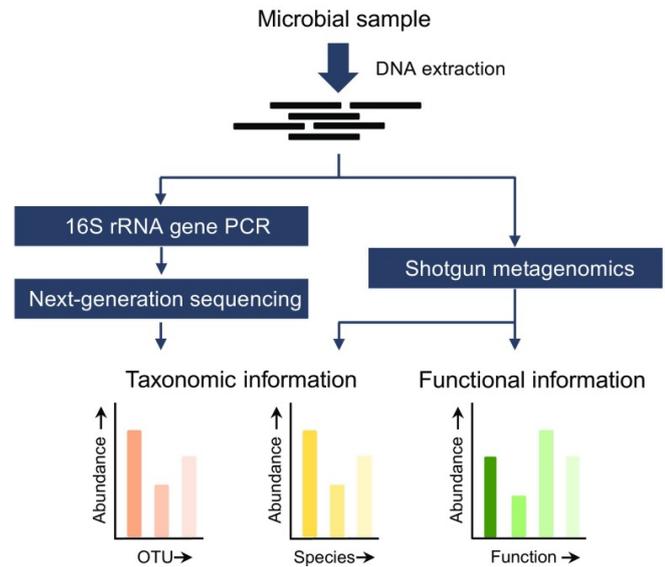
Aunque el principio de la dPCR fue desarrollado en 1992, no ha sido recientemente, con el avance de las técnicas de microfluidos y la posibilidad de automatización, que ha adquirido su pleno potencial. Actualmente existen “chip” que contienen 20000 pocillos individuales en los que la muestra es repartida.

Un segundo método se basa en la emulsión de los componentes de la PCR, la muestra y un aceite, que, a continuación, va a ser dividido en 10 millones de gotitas de un volumen de picolitro (cada una conteniendo un máximo de una copia de molde). Una vez realizada la PCR, se determina la señal de fluorescencia en cada gotita mediante citometría de flujo.

#### 4.1.4. Métodos basados en la secuenciación masiva de ácidos nucleicos

El método de secuenciación Sanger, fue descrito inicialmente en 1976, y desde entonces ha experimentado grandes procesos de automatización que han culminado con el reciente desarrollo de métodos de secuenciación a escala genómica (Whole-Genome Sequencing, WGS). Estos métodos de secuenciación masiva también están revolucionando el campo del diagnóstico clínico. (Fig. 12)

**Figura 12. Vista general de la NGS del ARNr 16S y los métodos shotgun de metagenómica.** Ambos métodos empiezan con la extracción de ácidos nucleicos de una muestra biológica. Entonces se amplifica el ARNr 16S de la muestra por PCR o se corta en pequeños fragmentos (metagenómica shotgun). Los amplicones de ARNr 16S obtenidos por PCR o los fragmentos pequeños se secuencian mediante técnicas de secuenciación de nueva generación. Finalmente, todos los datos se procesan mediante el empleo de algoritmos bioinformáticos que permiten al investigador explorar la composición taxonómica y/o la capacidad funcional de la muestra. OTU (Operational taxonomic units) es un grupo de secuencias muy similares. *Figura en Boers et al. (2019).*



La secuenciación masiva (Next-Generation Sequencing, NGS) permite la secuenciación simultánea de millones de secuencias presentes en una muestra.

Entre las ventajas de estos métodos es que permite secuenciar, y por tanto identificar, la presencia de los distintos organismos presentes en una muestra. Así, por ejemplo, la técnica NGS se puede utilizar para determinar la comunidad microbiana presente en las vías respiratorias de pacientes. Así, la posibilidad de definir la comunidad microbiana en estados de enfermedad tiene un valor añadido a la hora de desarrollar estrategias terapéuticas. Otra ventaja de la técnica es que permite identificar a organismos que no es posible cultivar y que habían pasado desapercibidos en las técnicas clásicas de diagnóstico clínico.

Estas técnicas también tienen gran utilidad pues permite determinar variantes virales y su evolución. Así, esta técnica se ha utilizado para determinar cuasiespecies de HIV y la emergencia de subpoblaciones resistentes. La detección temprana de virus mutantes es de gran utilidad para la selección de la terapia antirretroviral apropiada

Un inconveniente de esta técnica, común al resto de técnicas de detección de ácidos nucleicos, es que la presencia de secuencias correspondientes al genoma de un microorganismo no es una prueba de que el organismo esté presente, sino que pueden corresponder a restos del microorganismo que, incluso eventualmente, hayan podido quedar atrapadas en el tracto respiratorio durante la respiración.

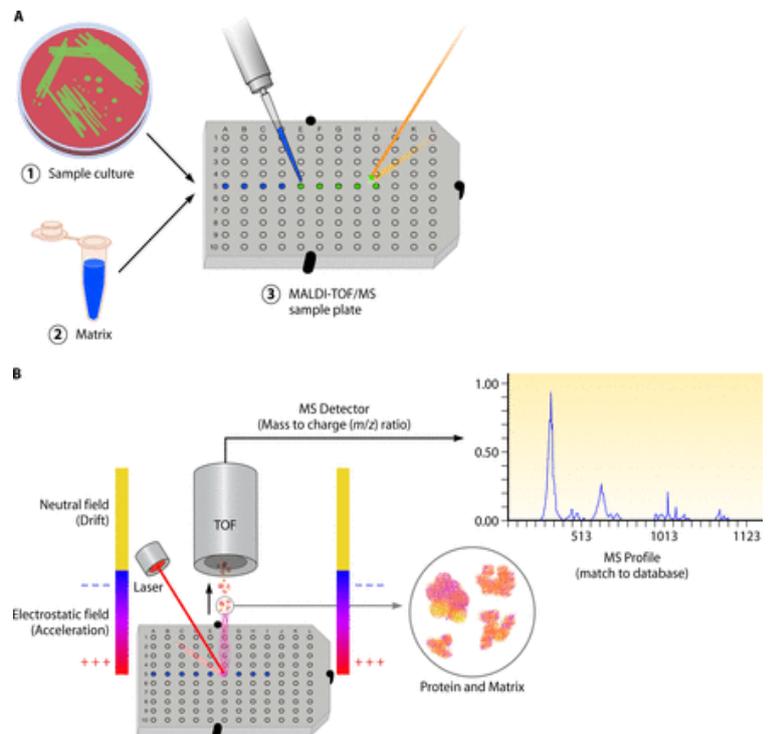
#### 4.1.5. Métodos basados en la espectrometría de masas

En los últimos años, los métodos basados en la espectrometría de masas empiezan a ser aplicados ampliamente en la identificación de bacterias y otros microorganismos en los laboratorios de microbiología clínica. Entre los métodos de espectrometría de masas se encuentran la ionización por electro-spray (“electrospray ionization”, ESI-MS), MALDI-TOF (“matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight”) y las tecnologías de identificación basadas en trampa iónica.

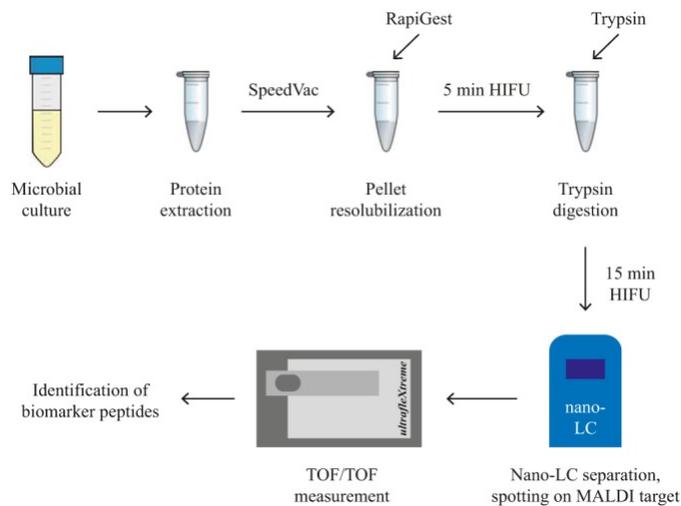
La técnica de MALDI-TOF permite el análisis de grandes macromoléculas, incluyendo los ácidos nucleicos y las proteínas. Los analitos, que pueden ser bacterias completas, son colocados en la superficie de una placa metálica y embebidos en una matriz ácida (por ejemplo, alphacyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) o 2,5-dihydroxybenzoic acid (DBA)). Al excitar con un láser de nitrógeno se produce una transferencia de carga desde la matriz al analito, lo que provoca la desorción de las partículas ionizadas. Los iones resultantes son acelerados a través de un tubo de vacío que separa los iones de acuerdo al ratio masa/carga ( $m/z$ ). Al final del tubo se encuentra un analizador de masas que detecta los iones y genera un espectro de masas donde se representa en el eje de abscisas (“x”) la ratio  $m/z$  de cada ion presente en la muestra y en el eje de ordenadas (“y”) la abundancia relativa. Cada analito tiene un espectro característico.

Para la aplicación de esta técnica a la identificación de microorganismos es preciso realizar un número grande de repeticiones para generar un perfil consenso que sirva de referencia.

**Figura 13. Espectrometría MALDI-TOF.** (A) La preparación de muestras para análisis con espectrometría de masas MALDI-TOF puede ser por transferencia directa de una colonia bacteriana a la placa muestra utilizando una herramienta estéril (puntos verdes) o como un líquido sobrenadante tras un procedimiento de extracción (puntos azules). En cualquiera de los métodos, el analito puede secarse antes de ser cubierto por una matriz ácida débil. (B) Comienza el análisis con la exposición de la muestra al láser, que ioniza y desorbe al analito de la placa de muestra. Los iones creados son acelerados a través del tubo de vacío de tiempo de vuelo por aplicación de un campo electrostático hasta que alcanzan el detector MS. Los iones con un ratio alto de masa/carga tardarán más tiempo en llegar al detector que aquellos con ratios pequeños. El perfil MS es creado representando el ratio masa/carga de cada especie de ion sobre el eje x y la abundancia relativa de esa especie en el eje y. El perfil MS es comparado con una librería de referencias ya definidos para establecer la mejor coincidencia con el aislado que se está analizando. *Modificada a partir de la figura en Bachun & Ledebner (2014)*



Este método se viene utilizando desde hace unos diez años para la identificación de aislados bacterianos y fúngicos. Es barato y rápido, pues puede dar un resultado de identificación unos 30 segundos después de colocar la muestra en el aparato de MALDI-TOF (**Fig. 13**). Mientras que la identificación de un microorganismo por métodos clásicos requiere días o incluso semanas (por ejemplo, se requieren unas 12 semanas de trabajo para la identificación certera de una tuberculosis mediante técnicas microbiológicas convencionales). En la **figura 14** encontramos un esquema del proceso que se realiza para identificar microorganismos por MALDI-TOF, el primer paso sería aislar el microorganismo en cultivo y posteriormente usar el cultivo para el análisis.



**Figura 14. Flujo de trabajo para la preparación de digestiones tríplicas de extractos celulares de *S. enterica* subespecie *arizonae*, *S. enterica* subespecie *enterica* y *S. enterica* subespecie *hountenae* y el sub-siguiente análisis de MALDI-TOF/TOF MS.** El extracto celular usado para biotipado se seca en una SpeedVac. Después de resuspender el sedimento mediante la adición del detergente RapiGest y 5 minutos de tratamiento de ultrasonidos de alta intensidad concentrados (HIFU), se añade la tripsina y las proteínas se digieren durante 15 minutos bajo el tratamiento HIFU en un baño de agua fría. Los péptidos se separan por nano-LC y se mezclan con una matriz HCCA directamente en el colector de fracciones y se separan por MALDI. Se realiza el análisis MALDI-TOF/TOF y los resultados se escanean para identificar péptidos candidatos a constituirse como un biomarcador. *Figura en Gekenidis et al. (2014).*

Una desventaja de la técnica en su aplicación al diagnóstico clínico es que es preciso obtener colonias puras del microorganismo, y, por tanto, su cultivo en medios sólidos. Se precisa un mínimo de 150000 bacterias para generar un espectro suficientemente informativo para proceder a la identificación del microorganismo. Por otro lado, todavía no existen métodos de análisis capaces de separar los espectros individuales de microorganismos presentes en una mezcla. Estas limitaciones hacen que la técnica MALDI-TOF no pueda utilizarse para el análisis directo de muestras clínicas.

No obstante, hay algunos casos en los que la técnica puede ser utilizada para la identificación de infecciones bacterianas en muestras de orina. En estos casos, la orina, primeramente, se somete a una centrifugación a baja velocidad para retirar leucocitos y a continuación a alta velocidad para colectar las bacterias presentes. Si en la muestra de orina existen más de 100000 bacterias de una misma especie, esta técnica permite su identificación. Claro, un factor limitante para la identificación es que el agente infeccioso se encuentre en la biblioteca de referencia de perfiles de masas.

En los últimos años, se está explorando la utilización de la técnica MALDI-TOF para la determinación de susceptibilidad a antimicrobianos. La detección de enzimas que modifican las drogas, por ejemplo, beta-lactamasas y enzimas modificadoras de aminoglicósidos, directamente en las muestras es difícil, debido a su baja expresión. Asimismo, tampoco es posible determinar modificaciones en los blancos mediante metilación o mutaciones puntuales, por la razón de su relativamente baja abundancia y la pequeña diferencia en la ratio  $m/z$  entre la proteína normal y la modificada. Se han diseñado estrategias para salvar estos obstáculos. Así, en el caso de la resistencia a beta-lactámicos, el antibiótico hidrolizado puede ser detectado por MALDI-TOF tras 1-3 horas de incubación de la bacteria con el correspondiente antibiótico. La sensibilidad del método es próxima al 100%.

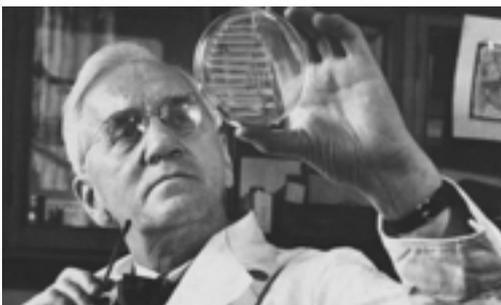
## 5. ANTIBIÓTICOS

Aunque el término antibiótico podría incluir a cualquier sustancia con efectos frente a un organismo vivo, en realidad ha pasado a ser un término utilizado para referirse a los fármacos con actividad antibacteriana. Los antibióticos han traído unos beneficios sin precedentes para la salud, protección y cura frente a las enfermedades bacterianas desde que se comenzaron a aplicar, en los años 40-50 del siglo pasado.

El primer antibiótico fue descubierto por Alexander Fleming (**Fig. 15**) en 1928. En sus experimentos cultivaba colonias de *Staphylococcus aureus* en placas Petri. Un día observó como en una de ellas había aparecido un moho. Al tiempo, alrededor del mismo había una zona en la que ya no había colonias bacterianas. Es decir, observó como una sustancia producida por el hongo llevaba a la lisis bacteriana. El hongo se llamaba *Penicillium notatum* y la sustancia se llamó, por tanto, Penicilina.

Este hecho ha sido un hito histórico que ha cambiado el mundo, pero cabe destacar que, hoy en día, la resistencia de los estafilococos a penicilina se estima en un 95%, y *Staphylococcus aureus* ha acumulado resistencia a prácticamente todos los antibióticos utilizados actualmente.

Esto es debido a que de forma consciente o inconsciente estamos creando condiciones selectivas para la emergencia de patógenos "superiores" que no pueden ser controlados por los antibióticos.

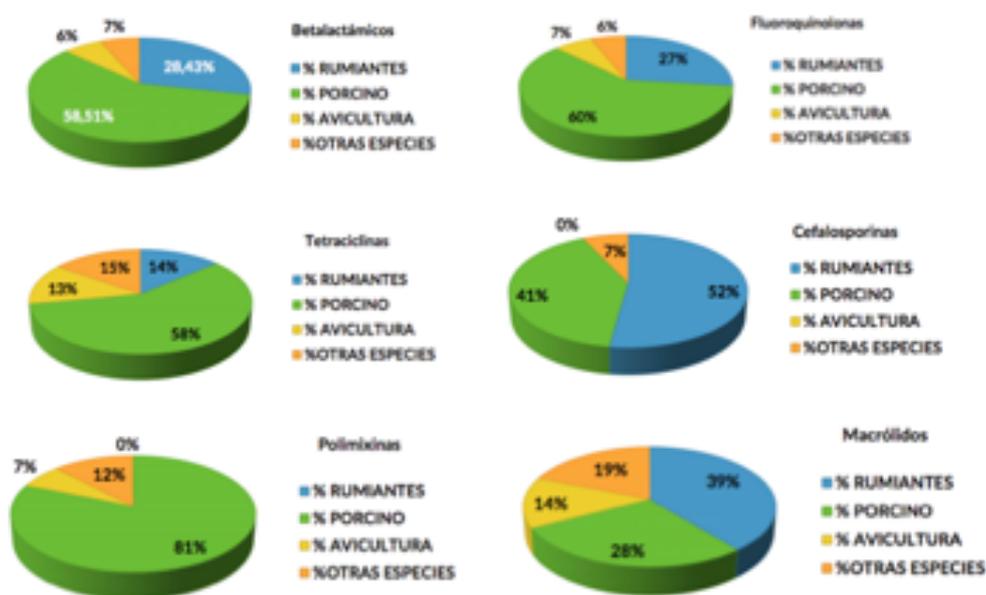


**Figura 15. Alexander Fleming.** Nacido el 6 de agosto de 1881 en Londres. Fue un médico y científico descubridor de la penicilina. En 1945 se le concedió el Premio Nobel de Medicina. *Figura modificada de El País.*

El grave problema de las resistencias a drogas es debido en gran parte al mal uso que de los antibióticos se hace. Así, se estima que alrededor del 50% de las prescripciones de antibióticos son dados sin una evidencia clara de infección o sin una indicación médica adecuada. Por ejemplo, en muchos casos se administran drogas antibacterianas a pacientes con gripe, neumonía viral, o incluso anginas que son, en dos de cada tres casos, producidas por infecciones virales. Frecuentemente, los antibióticos se prescriben sin cultivo e identificación del patógeno o sin determinar la sensibilidad bacteriana a la droga. Así, con frecuencia se dan antibióticos de amplio espectro en lugar de otros más específicos o restringidos para obviar el cultivo y análisis de sensibilidad, con la consecuencia de favorecer la selección de mutantes de resistencia a antibióticos.

El gran consumo de antibióticos a nivel mundial, que se estima entre 100.000 y 200.000 toneladas al año, hace que los antibióticos sean detectables en muestras de suelo y de agua. La presencia de estos antibióticos actúa de fuerza de selección de bacterias resistentes.

La utilización de antibióticos en los alimentos para animales es indudablemente otro factor que contribuye a aumentar el problema de resistencia a drogas. La adición de bajos niveles de antibióticos a estos alimentos favorece un mejor rendimiento en la producción, como consecuencia de disminuir las infecciones que normalmente se producen en granjas donde los animales están muy amontonados (vacas, cerdos, pollos y peces).



**Figura 16. Porcentaje estimado de consumo de los diferentes antibióticos por especies en el año 2016.** Informe JIACRA mayo 2018

La distribución del suministro de diferentes tipos de antibióticos a las especies con el fin de mejorar el rendimiento de su producción se muestra en la **figura 16**.

Así, las cantidades de antibióticos utilizados para la salud animal son enormes si se compara con el consumo en humanos. Esta práctica conduce a un aumento en el número de bacterias resistentes en estos animales. Hay evidencias del paso de bacterias resistentes como Salmonella desde animales a las poblaciones humanas: existe una correlación positiva entre los porcentajes de resistencia a quinolonas y a tetraciclinas para las cepas de Salmonella spp aisladas de animales y de humanos (Fig. 17)

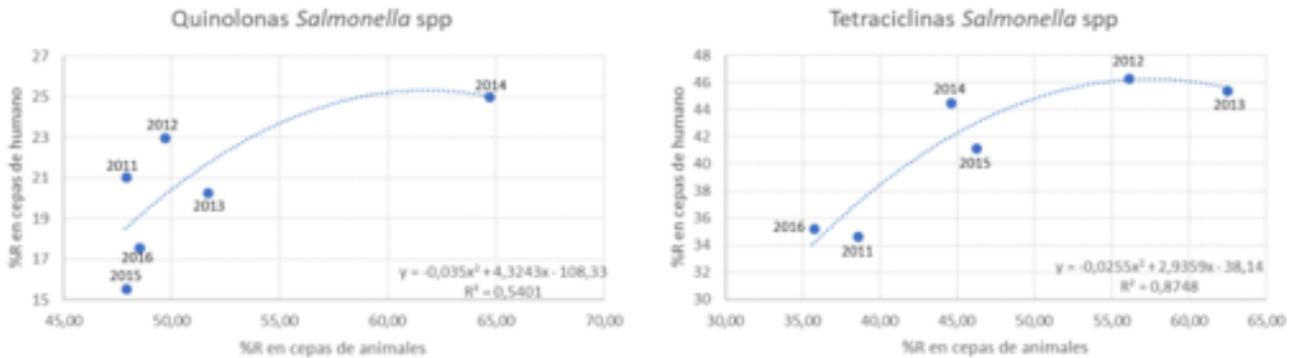


Figura 17. Correlaciones cuadráticas entre los porcentajes de resistencia de cepas de Salmonella spp aisladas de animales y humanos a quinolonas y tetraciclinas entre 2011 y 2016. Informe JIACRA mayo 2018.

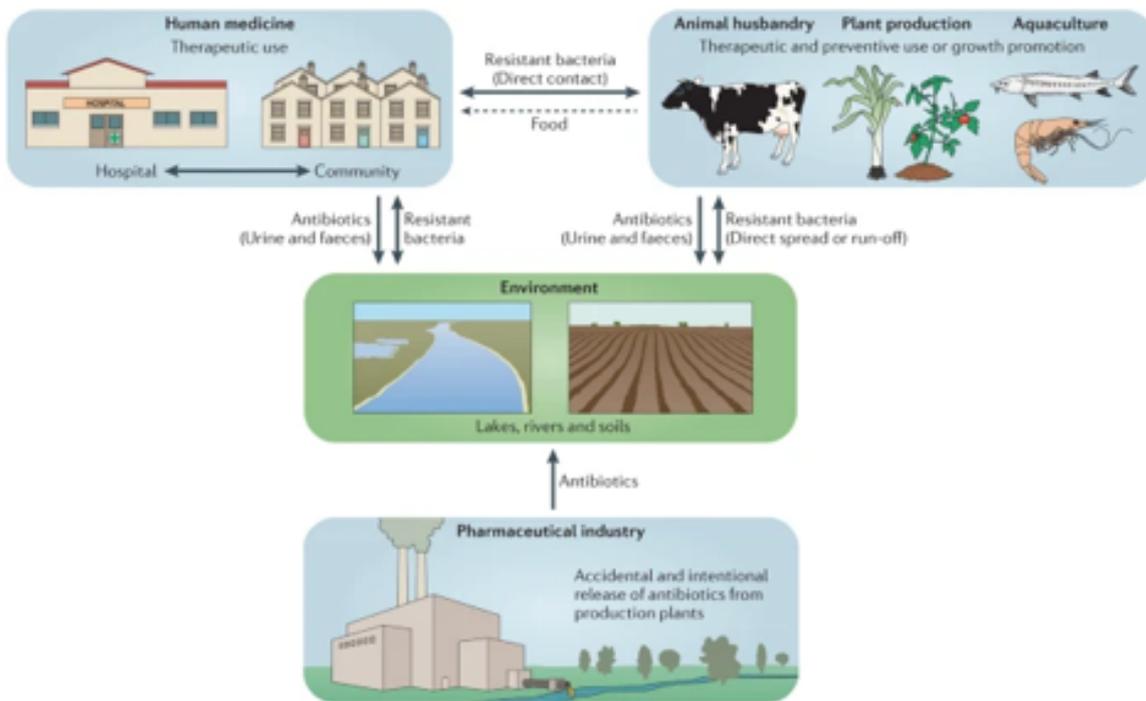


Figura 18. Ecología de los antibióticos y resistencia a los mismos. Visión global de los antibióticos a partir del entorno médico, la agricultura, la acuicultura, la ganadería o la industria farmacéutica y como llegan al medio ambiente. Un porcentaje elevado de ellos llegan en su forma activa, ya sea a través de orina y heces o a través de liberaciones intencionadas o accidentales por parte de las plantas de producción. La presencia de estos antibióticos en el medio supone una presión selectiva para las bacterias, siendo seleccionadas aquellas resistentes que a su vez son capaces de ser transmitidas en los diferentes entornos y que van adquiriendo genes y determinantes de resistencia. Modificada a partir de la figura en Andersson y Hughes (2014).

En resumen, en el medio ambiente existen unos niveles significativos de antibióticos, procedentes de bacterias y hongos que los producen de forma natural, de la excreción de antibióticos por pacientes tratados, de la utilización de antibióticos en granjas y en acuicultura, y la contaminación ambiental procedente de fábricas de producción de antibióticos. Así, una fracción importante de los antibióticos (entre el 20-80%, dependiendo del tipo) terminan liberados, en forma químicamente activa, al ambiente, contaminando ríos, lagos, suelos y productos alimentarios (leche, carnes y verduras). Estos antibióticos, en cantidades subclínicas, van a ejercer sus efectos sobre las bacterias, favoreciendo el desarrollo de cepas resistentes (**Fig. 18**). Algunos autores plantean que ahora estamos en la 'época de la resistencia a antibióticos'.

### 5.1. Los antibióticos y el microbiota

El término microbiota hace referencia a la abundante y diversa población de bacterias, arqueobacterias y eucariotas que se encuentran en zonas expuestas del cuerpo, dándose las mayores concentraciones de estos organismos en el tracto gastrointestinal.

El microbiota protege al hospedador de patógenos invasores a través de varios mecanismos, que incluyen competición por el espacio y los sitios de unión, competición por nutrientes e inhibición directa mediante la liberación de moléculas inhibitorias.

Aunque los antibióticos han sido, y continúan siendo, unas herramientas fundamentales para el control de las enfermedades infecciosas, éstos tienen un impacto negativo sobre el microbiota y, en consecuencia, sobre el hospedador.

Si bien los antibióticos tienen como blanco a organismos patogénicos, diversos microorganismos del microbiota van a resultar afectados, con lo que se va a producir una alteración de las poblaciones del intestino, que va a requerir de mucho tiempo para reestablecer el equilibrio, una vez que cese el tratamiento con antibióticos. Disbiosis es un término frecuentemente utilizado para referirse al efecto de los tratamientos antibióticos, ya que este término hace referencia a un desbalance en la estructura microbiana de nuestro microbiota, que conduce a una ratio anormal de especies bacterianas comensales y patogénicas. Para corregir estos desbalances con frecuencia se recurre al uso de:

- **Probióticos:** se definen como microorganismos vivos que se administran con el objetivo de mejorar el balance de microorganismos que conforman la flora intestinal; los principales microorganismos utilizados como probióticos son bacterias productoras de ácido láctico de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

- **Prebióticos:** son ingredientes alimentarios destinados a cambiar la composición y actividad de la flora intestinal del colon. Estos son fundamentalmente carbohidratos no hidrolizables por las enzimas gástricas y polifenoles, que sí van a ser utilizados por las bacterias presentes en el colon (lactobacilos y bifidobacterias), que a su vez van a producir metabolitos beneficiosos para otros microorganismos de la flora intestinal y también para los colonocitos, lo que resulta en un mejor funcionamiento del tejido intestinal.

Por otro lado, el uso de antibióticos también promueve la expansión de las cepas resistentes a antibióticos, que actuarán como reservorios de genes de resistencia en el microambiente del intestino.

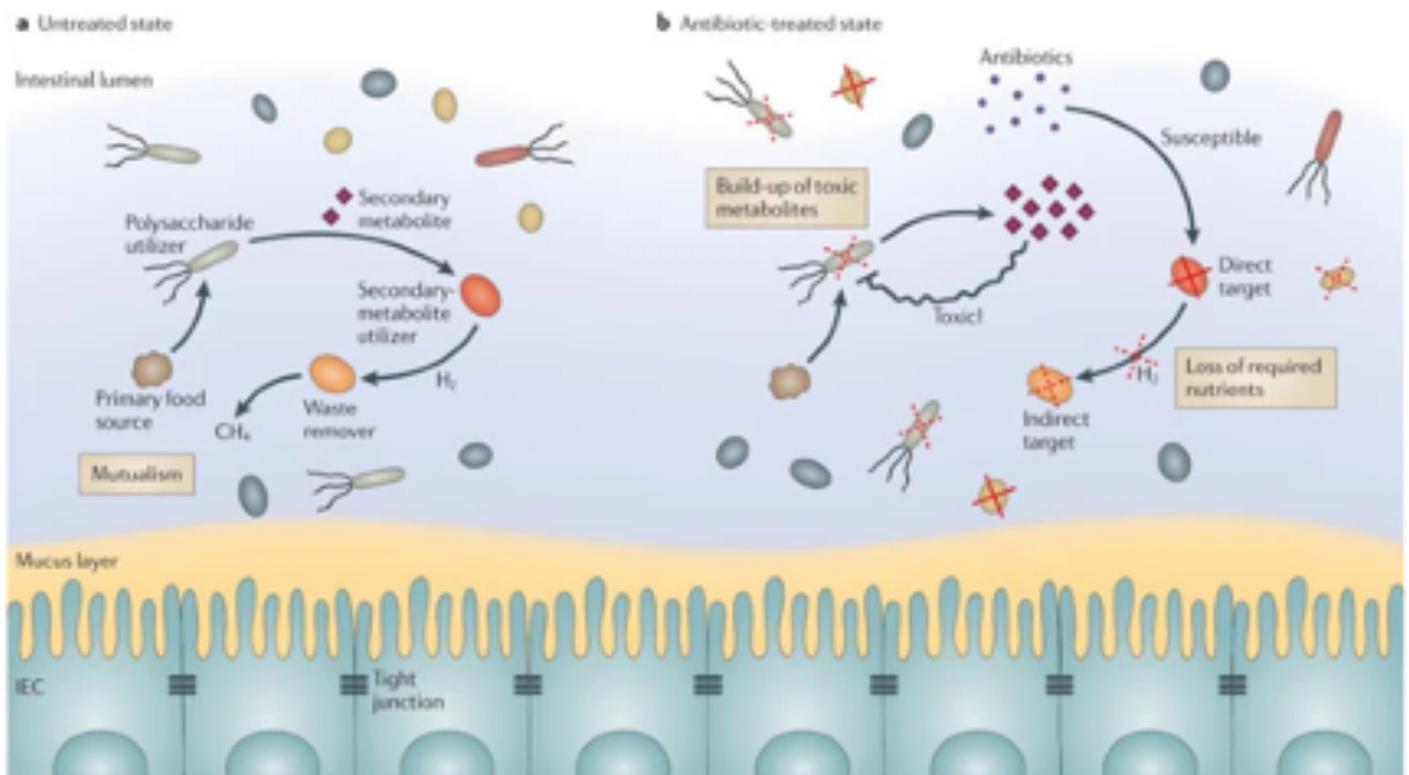
Los microorganismos que son afectados por la terapia antibiótica no son solo aquellos que son blanco directo de los antibióticos, ya que existe una red compleja de co-dependencia entre miembros del microbiota basados en vías de producción y utilización de metabolitos.

Debe tenerse en cuenta que los efectos sobre el microbiota intestinal y la inmunidad de las mucosas no se limita a los antibióticos administrados por vía oral, sino que los antibióticos inoculados por vía sistémica van a impactar sobre el microbiota intestinal, ya que pueden llegar al intestino a través del sistema biliar.

A lo largo de la evolución de los mamíferos se ha producido una selección del microbiota por su importancia en la provisión de nutrientes y en la regulación de la función inmunitaria.

Como se ilustra en la **figura 19**, los antibióticos tienen efectos directos e indirectos sobre el microbiota intestinal. Existen relaciones de mutualismo entre los microorganismos del intestino y el hospedador, dándose codependencia metabólica en muchos casos. Por ejemplo, como se ilustra en la figura, un microorganismo capaz de utilizar polisacáridos adquiere estos nutrientes presentes en el alimento ingerido, obteniendo energía y produciendo una serie de metabolitos secundarios. Estos metabolitos secundarios, a su vez, van a servir de nutrientes para otros microorganismos, que a su vez van a generar productos de desecho, como el H<sub>2</sub>, que van a ser utilizados por otros microorganismos para generar su propia energía (por ejemplo, a través de la metanogénesis).

Cuando se emplean antibióticos, muchas de estas relaciones simbióticas se rompen al resultar los microorganismos afectados por los antibióticos. Esto puede tener como consecuencia la acumulación de metabolitos secundarios tóxicos o la no generación de nutrientes para los microorganismos encargados de retirar productos de desecho.



**Figura 19. Efectos directos e indirectos de los antibióticos en la microbiota intestinal.** a. Se produce mutualismo entre simbioses intestinales y el hospedador en ausencia de antibióticos. Un microorganismo de la microbiota utiliza nutrientes del entorno como fuente de energía produciendo a su vez metabolitos secundarios que son usados como fuente de energía por otro microorganismo que a su vez genera productos de desecho que son utilizados por un tercer microorganismo. Este tercer microorganismo también generará productos de desecho. b. Los antibióticos suministrados no solo van a eliminar las bacterias patógenas, sino que también van a destruir la microbiota rompiendo el mutualismo. Si se elimina un microorganismo, este no va a consumir los metabolitos que le corresponden pudiendo llegar a ser tóxicos para el resto. Además, al ser eliminado no va a generar productos de desecho que servirán como fuente de energía para otros microorganismos. Es decir, se va a dar una descompensación del entorno de la microbiota intestinal. *Modificada a partir de la figura en Willing et al. (2011).*

Una característica común al tratamiento con antibióticos es una reducción en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, "short-chain fatty acids"), y la reducción de los SCFAs tiene efectos directos en la salud intestinal. Los SCFAs son absorbidos rápidamente en el colon, ya que suponen la fuente energética preferida de los colonocitos y regulan la proliferación celular, la diferenciación, el crecimiento y la apoptosis. El butirato es el SCFA con el mayor efecto sobre el ciclo celular y ha sido además implicado en la regulación de muchos aspectos de la inmunidad intestinal.

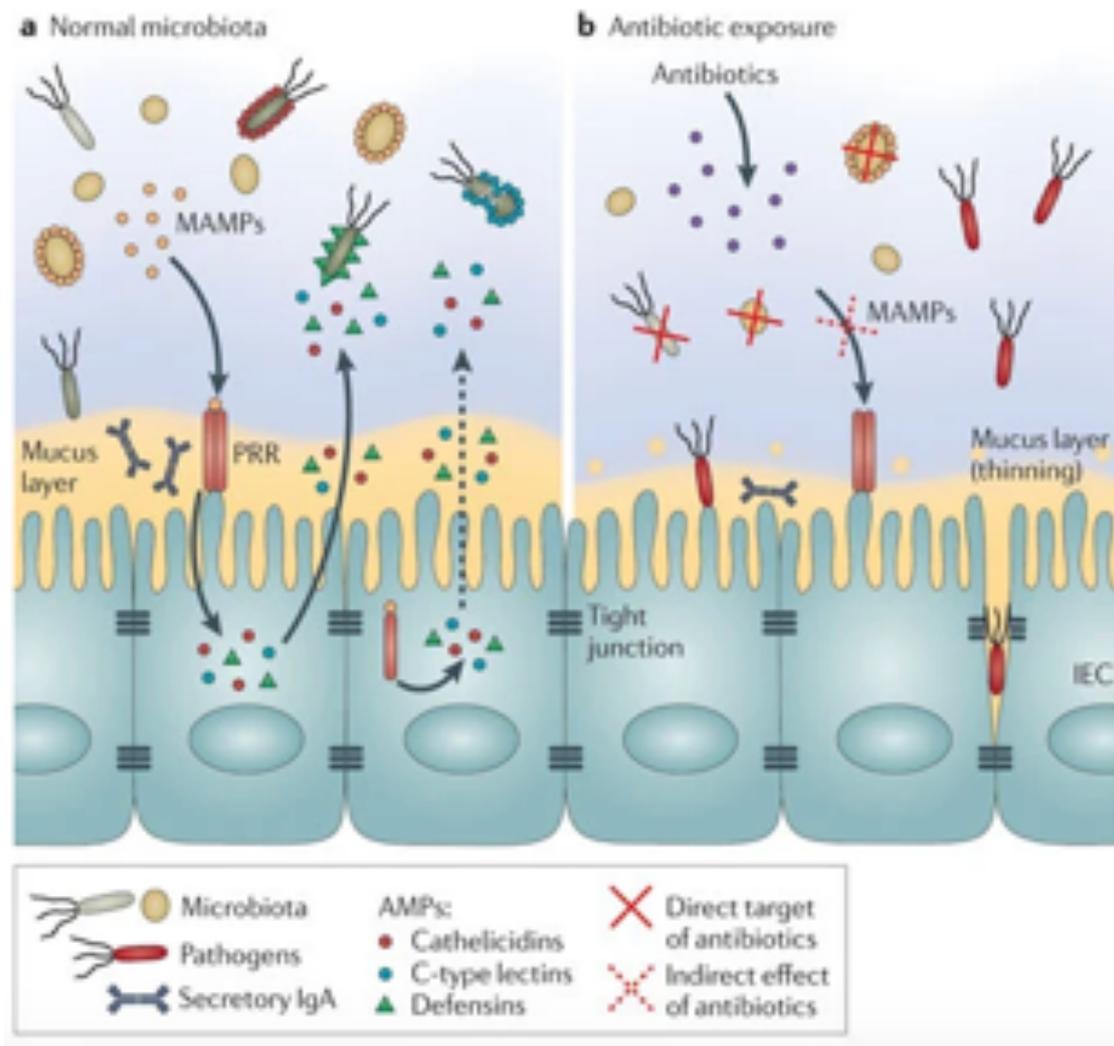
Por otro lado, los antibióticos de forma indirecta van a afectar al sistema inmunitario. Un mecanismo importante por el que el microbiota afecta al sistema inmunitario del hospedador es a través de la activación de los receptores que reconocen los MAMP (“microorganism-associated molecular pattern”), tales como los TLRs (“Toll-like receptors”) y los NLRs (“NOD-like receptors”). Estos PRRs (“pattern recognition receptors”) son activados por diversos ligandos presentes en los microorganismos intestinales, entre los que se incluyen el lipolisacárido (LPS), los ácidos lipoteicoicos (LTA), la flagelina, secuencias CpG del DNA y el peptidoglicano.

La depleción del microbiota por el uso de antibióticos reduce la cantidad de MAMPs que entran en contacto con el epitelio, lo que supone una reducción de la señalización a través de TLR y, por tanto, una activación reducida de las defensas innatas. Los animales libres de gérmenes tienen poco desarrollado el tejido linfoide, tienen poblaciones reducidas y desbalanceadas de linfocitos T, la permeabilidad intestinal está aumentada, la expresión de péptidos antimicrobianos (AMPs, “antimicrobial peptides”) está disminuida y también la expresión de inmunoglobulina A.

Los AMPs, entre los que se incluyen las lectinas tipo-C, las defensinas y las catelicidinas, son la primera línea de defensa frente a los patógenos invasores, ya que son secretados dentro de la capa de mucus.

La **figura 20** ilustra cómo los antibióticos inciden sobre la homeostasis epitelial en el intestino y aumentan la susceptibilidad del hospedador a los patógenos invasores. Los PRRs que reconocen a los MAMPs procedente del microbiota instruyen a unas células del epitelio intestinal (IECs, “intestinal epithelial cells”) denominadas células de Paneth para la producción de péptidos antimicrobianos dentro de la capa de mucus que las recubre. Los AMPs y la IgA secretada son importantes para controlar los números de bacterias y mantener la homeostasis epitelial. Las uniones estrechas y la capa gruesa de mucus impiden a los patógenos dañar la barrera intestinal. Como consecuencia del tratamiento con antibióticos se va a producir una alteración de la homeostasis intestinal. Grupos de la microbiota normal son eliminados, lo que conlleva una disminución en los MAMPs que son expuestos a las células epiteliales y, como consecuencia, a una menor señalización a través de los PRRs, lo que se manifiesta en una producción disminuida de AMPs. La baja producción de AMPs y la alteración de la barrera epitelial facilita la invasión por parte de patógenos entéricos.

El efecto de los antibióticos sobre la activación del sistema inmunitario encaja dentro de la hipótesis de la higiene. Estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto una correlación entre la utilización temprana de antibióticos y un riesgo aumentado de sufrir alergias. Así, se piensa que una menor exposición a microbios durante la infancia afecta al desarrollo del sistema inmunitario, lo que tiene como consecuencia un aumento de hipersensibilidad alérgica.



**Figura 20. Los antibióticos alteran la homeostasis del epitelio intestinal y aumentan la susceptibilidad de infección del hospedador por patógenos.** **a.** En ausencia de antibióticos existe una homeostasis epitelial. Patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) de la microbiota son reconocidos de modo intracelular y extracelular a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Al producirse la interacción entre los PRR y los MAMPs se desencadena la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs) por las células del epitelio intestinal (IECs) o células Paneth. Entre las células epiteliales existen uniones estrechas que previenen de la entrada de patógenos. Los péptidos antimicrobianos pueden ser lectinas tipo C, catecidinas o defensinas y son vertidos a la capa mucosa. Junto con inmunoglobulinas A son capaces de mantener la homeostasis. **b.** El tratamiento con antibióticos rompe la homeostasis ya que se eliminan microorganismos, disminuyen los MAMPs y con ello la señalización reduciendo así la producción de AMPs. Además, algunos antibióticos son capaces de romper las uniones estrechas y disminuir el grosor de la capa mucosa. En conjunto, se da pie a la invasión de patógenos entéricos. *Modificada a partir de la figura en Willing et al. (2011).*

## 5.2. Características generales de los antibióticos

La mayoría de los antibióticos descubiertos durante los pasados 60-70 años se han descubierto a través de la búsqueda en muestras del suelo de productos naturales que mataran bacterias, incluidos patógenos conocidos, primero sobre placas de cultivo y después en infecciones animales.

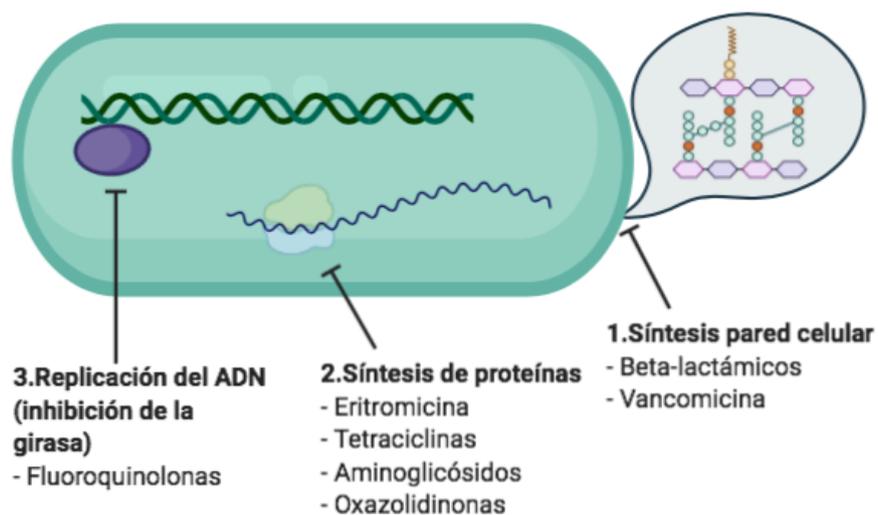
El periodo 1945-60 se considera la “era dorada” de los antibióticos, pues fue entonces cuando la mayoría de las clases químicas de antibióticos, actualmente en uso, fueron descubiertos. Entre estos se incluyen las penicilinas y cefalosporinas de hongos y diferentes antibióticos de la bacteria filamentosa *Streptomyces* como son la estreptomina, la eritromicina, la tetraciclina y la vancomicina.

Durante el periodo 1970-80 se llevaron a cabo modificaciones químicas sobre las estructuras básicas de los antibióticos para mejorar su farmacología y evitar las resistencias. Modificaciones semisintéticas han producido  $\beta$ -lactamos de segunda y tercera generación para las familias de penicilina y cefalosporina. Mediante síntesis total se han creado eritromicinas de segunda generación: claritromicina y azitromicina. Hasta ahora, solo los fluoroquinolones (por ejemplo, la ciprofloxacina) constituyen una clase significativa de antibióticos que son totalmente sintéticos.

Sin embargo, actualmente, el descubrimiento de nuevos fármacos es prácticamente inexistente, lo que resulta preocupante si tenemos en cuenta que el problema que supone el aumento del número de bacterias patógenas que han desarrollado resistencia a antibióticos.

### 5.3. Blancos para las principales clases de drogas antibacterianas

En la **tabla 1** se resumen los blancos de acción para las principales clases de antibióticos, que son: (1) la biosíntesis de la pared celular bacteriana, (2) la síntesis de proteínas, y (3) la reparación y replicación del DNA (**Fig. 21**)



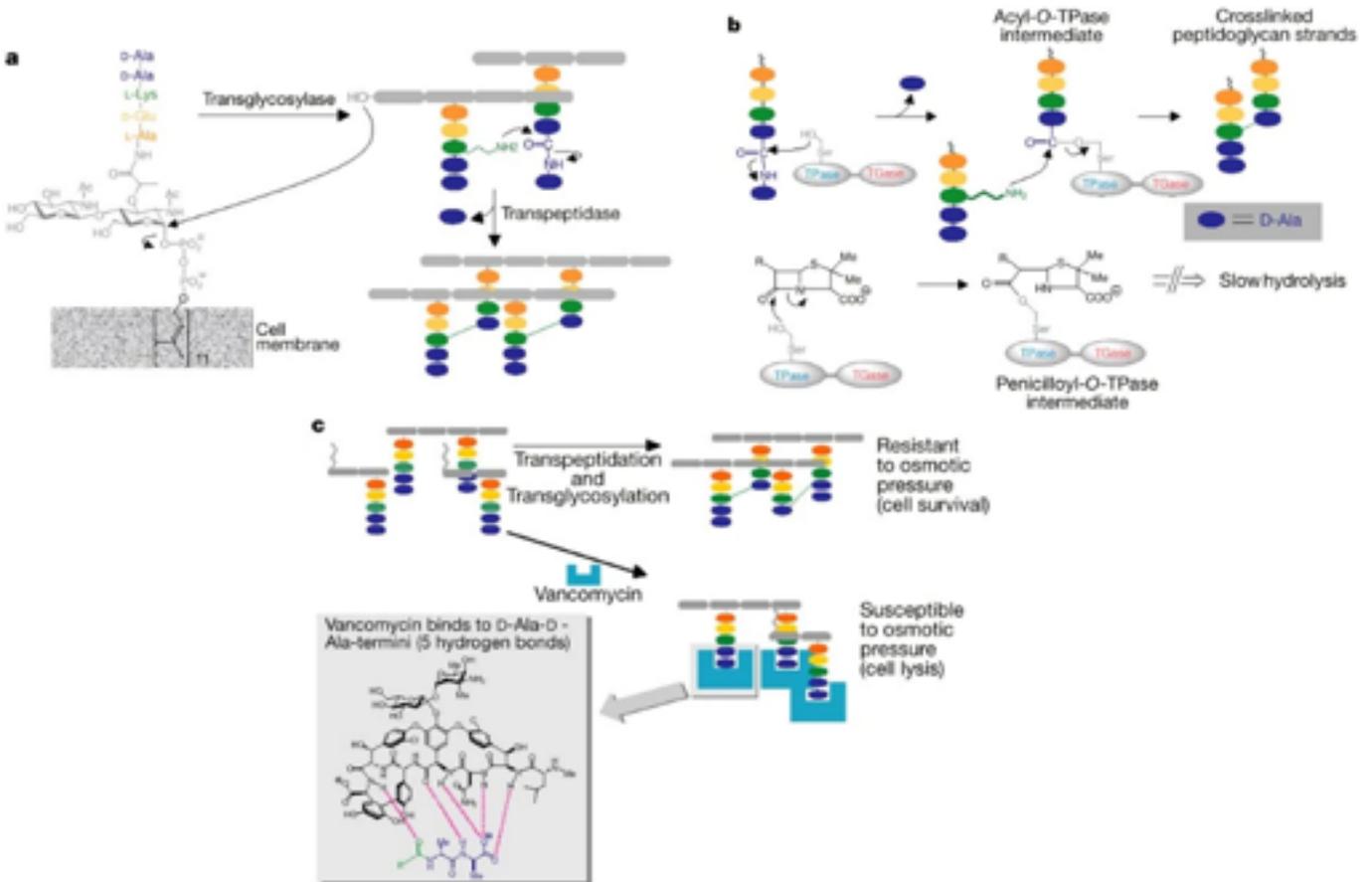
**Figura 21. Dianas de los antibióticos.** Cada tipo de antibiótico tiene una diana bacteriana sobre la que actúan modificando procesos como la replicación del ADN, la síntesis de proteínas o la síntesis de la pared celular. *Creada con Biorender.*

ANTIBIÓTICOS	DIANAS	MODO DE ACCIÓN	MECANISMO DE RESISTENCIA
<b>PARED CELULAR</b>			
<u>Beta-lactámicos</u>	<u>Transpeptidasa/Transglucosilasa (PBPs)</u>	Bloqueo de enzimas de entrecruzamiento en la capa de peptidoglicano de las paredes celulares	Beta-lactamasas, mutantes de PBP
Vancomicina	D-ala-D-ala terminal de peptidoglicano y de lípido II	El secuestro del sustrato necesario para la reticulación	Reprogramación de D-Ala-D-Ala a D-Ala-D-Lac o a D-Ala-D-Ser
<b>SÍNTESIS DE PROTEÍNAS</b>			
Macrólidos de la clase de eritromicina	Centro <u>peptidil transferasa</u> del ribosoma	Bloqueo de la síntesis de proteínas	Metilación de <u>rRNA</u> , bombas de flujo de drogas
Tetraciclinas	<u>Peptidil</u> transferasa	Bloqueo de la síntesis de proteínas	Bombas de flujo de drogas
<u>Aminoglicósidos</u>	<u>Peptidil</u> transferasa	Bloqueo de la síntesis de proteínas	Modificación enzimática de la droga
<u>Oxazolidinonas</u>	<u>Peptidil</u> transferasa	Bloqueo de la síntesis de proteínas	Desconocido
<b>REPLICACIÓN/REPARACIÓN DE DNA</b>			
Fluoroquinolonas	DNA girasa	Bloqueo de la replicación del DNA	Mutaciones en la girasa a la resistencia de drogas

**Tabla 1. Objetivos probados para los medicamentos antibacterianos.** La biosíntesis de la pared celular en la etapa de entrecruzamiento de las cadenas peptídicas por las transpeptidasas y transglucosilasas se inhibe por los antibióticos betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas). La biosíntesis de proteínas en el ribosoma es diana de varias clases de antibióticos, entre ellos macrólidos, tetraciclinas, aminoglicósidos y oxazolidinonas, que bloquean uno o más pasos del rARN y las proteínas del ribosoma en el centro de la peptidil transferasa. Los antibióticos de fluoroquinolona interrumpen la replicación del ADN atrapando un complejo de ADN unido a la enzima ADN Girasa, una topoisomerasa de tipo II.

### 5.3.1. Biosíntesis de la pared celular

La capa de la pared celular bacteriana que confiere fuerza es el peptidoglicano, una malla de péptidos y de glicano que están entrecruzados covalentemente (**Fig. 22a**). Cuanto mayor es la fracción de hebras de péptidos adyacentes que están conectados a través de uniones amida producidas por la acción de una familia de transpeptidasas, mayor es la fuerza mecánica frente a la lisis osmótica.



**Figura 22. Biosíntesis de la pared celular.** **a.** Interrupción del entrecruzamiento y de las enzimas que aportan resistencia a la pared bacteriana por antibióticos cuya función es inhibir a la enzima (penicilina) o secuestrar su sustrato (vancomicina). **b.** Inhibición de la actividad transpeptidasa por penicilinas a través de la formación de un intermedio covalente de hidrólisis lenta. **c.** Unión de la vancomicina a la D-Ala-D-Ala terminal estableciendo cinco puentes de hidrógeno. *Modificada a partir de la figura en Walsh (2000).*

Las transglicosilasas actúan sobre las hebras de glicano para extender las cadenas de azúcar mediante la incorporación de nuevas unidades de peptidoglicano a partir de N-acetilglucosamina- $\beta$ -1,4-N-acetylmuramyl-pentapeptide-pyrophosphoryl-undecaprenol (lipid II).

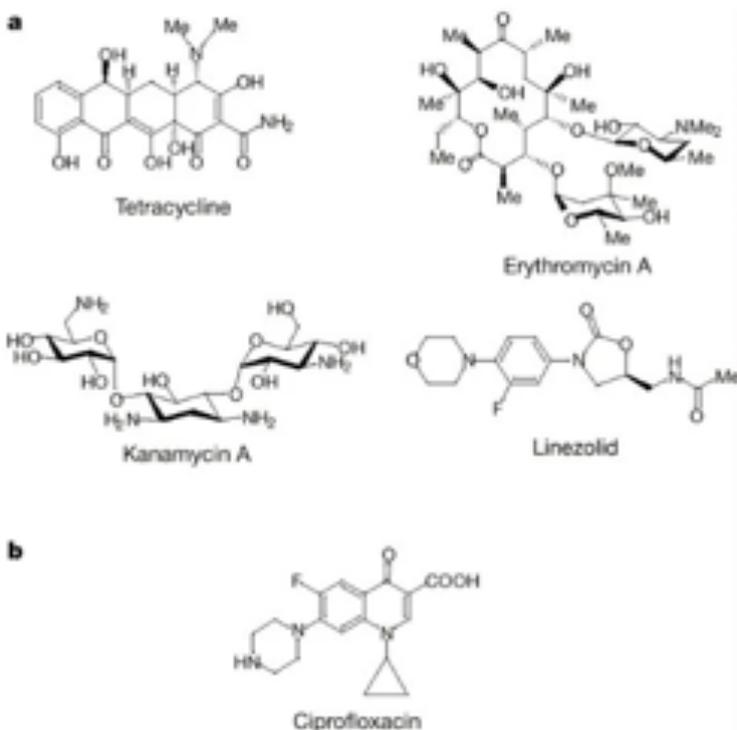
Las enzimas bifuncionales que contienen tanto el dominio transpeptidasa y transglicosilasa son el blanco de acción de la penicilinas y cefalosporinas que contienen el grupo  $\beta$ -lactamo, que actúan como pseudosubstratos acetilando los sitios activos de las transpeptidasas (también llamadas proteínas de unión a penicilina o PBPs;

**Fig. 22b).** Los sitios activos de estas enzimas se desacilan muy lentamente, lo que impide su acción normal de hacer cruzamientos de las cadenas peptídicas en la capa de peptidoglicano, lo que conduce a una debilidad mecánica y a una susceptibilidad a la lisis por cambios de presión osmótica.

La familia de la vancomicina (antibióticos glicopeptídicos) también interfiere con el ensamblaje de la capa de peptidoglicano, pero en lugar de interferir con las actividades enzimáticas implicadas en el entrecruzamiento se une al sustrato peptídico evitando que pueda interactuar con la actividad transpeptidasa. No obstante, el efecto neto es el mismo, al no poder realizarse los entrecruzamientos, la pared celular es más débil. La forma en copa de la vancomicina forma cinco enlaces de hidrógeno con el extremo dipeptídico D-Ala-D-Ala de cada cadena lateral pentapeptídica (**Fig. 22c**). Dado que los  $\beta$ -lactamos y la vancomicina actúan en etapas adyacentes –sustrato y enzima- actúan sinérgicamente cuando se emplean en combinación.

### 5.3.2. Síntesis de proteínas

Los RNAs y proteínas de los ribosomas procarióticos son muy distintos de los eucarióticos, lo que hace que existan muchos inhibidores específicos de la síntesis de proteínas con actividad antibacteriana selectiva. Entre éstos se encuentran los macrólidos de la clase de las eritromicinas, las tetraciclinas (que son productos de vías biosintéticas de policétidos aromáticos), los aminoglicósidos (de los que la estreptomina fue el miembro fundador y que ahora ha sido suplantado por variantes sintéticas como la kanamicina) y el grupo de las oxazolidinonas (linezolid). Sus estructuras químicas se muestran en la **figura 23a**.



**Figura 23. Diversidad estructural y funcional de fármacos antibacterianos.** a. Macrólidos de la clase eritromicina, tetraciclinas, aminoglicósidos representados por kanamicina y oxazolidinonas representados por linezolid. Estos compuestos tienen en común el blanco sobre el que actúan: rRNA de 23S y las proteínas asociadas al centro peptidil transferasa del ribosoma con el fin de inhibir la elongación de la cadena proteica. b. Las fluoroquinolonas, representadas por ciprofloxacina, matan a la bacteria inhibiendo la ADN girasa y la topoisomerasa IV atrapando al intermedio de ADN con rotura de las dos hebras. *Modificada a partir de la figura en Walsh (2000).*

### 5.3.3. Replicación y reparación del DNA

Los fluoroquinolones, tales como la ciprofloxacina (**Fig. 23b**), matan las bacterias a través de inactivar el enzima DNA girasa (**Tabla 1**), el enzima responsable de relajar los círculos superenrollados de DNA bacteriano de doble cadena que se obtienen después de cada ronda de replicación de DNA. Las DNA girasas son topoisomerasas tipo II y la rotura transiente de las dos hebras de DNA implica el anclaje reversible de los extremos 5' del DNA a residuos tirosil de cada una de las dos subunidades GyrA que constituyen el tetrámero activo (GyrA)<sub>2</sub>(GyrB)<sub>2</sub>. La ciprofloxacina forma un complejo con el enzima y el DNA roto, que hace que el DNA quede covalentemente unido a las subunidades GyrA. Este complejo no puede religar el DNA roto y, como una consecuencia, se acumulan las roturas en la doble cadena de DNA que conducen a la muerte celular.

### 5.4. Estrategias de las bacterias para neutralizar la acción de los antibióticos

Se dice que, una vez que un antibiótico ha mostrado ser efectivo y comienza a emplearse masivamente en humanos, sus días están contados. Por ejemplo, para la penicilina, la resistencia se empezó a notar dos años después de su introducción a mitad de los años 40.

La resistencia a los antibióticos ha sido llamada uno de los problemas de salud pública más apremiantes en el mundo. Se puede clasificar en aquella que se desarrolla de forma endógena, mediante mutación y selección, o de forma exógena, mediante transmisión a patógenos humanos desde organismos del entorno (productores de antibióticos, comensales, patógenos no de humanos, etc.) mediante transmisión génica horizontal.

Dado el gran número de bacterias que se dan en un ciclo infectivo, lo rápido de su tiempo de generación y la tasa intrínseca de mutación de 1 en 10<sup>7</sup> hacen que, por ejemplo, en un conjunto de 10<sup>10</sup> bacterias haya una mutación sobre un promedio de 1000 loci génicos. Si una de estas mutaciones confiere resistencia al antibiótico que está siendo aplicado, mientras que las bacterias sensibles mueren, la resistente crece, se hace dominante y ocupa el espacio vacante dejado por las bacterias muertas. Si un antibiótico es administrado a niveles subterapéuticos, la aparición de bacterias resistentes está totalmente garantizada.

Un mecanismo importante para la expansión rápida de genes de resistencia a través de poblaciones de bacterias es debido a que esos genes se localizan en plásmidos que se replican de forma independiente y son intercambiados entre células y especies bacterianas.

Existen tres grandes tipos de estrategias de resistencia a antibióticos:

- Bombeo hacia fuera de los antibióticos
- Destrucción del antibiótico
- Introducción de cambios en la estructura de la molécula blanco

#### **5.4.1. Bombeo hacia fuera de antibióticos**

Para que los antibióticos sean efectivos deben alcanzar sus blancos bacterianos y acumularse a concentraciones adecuadas. Algunas bacterias generan resistencia a drogas a través de la activación de sistemas de transporte. Estas bombas son variantes de las bombas de membrana que poseen todas las bacterias para mover dentro-fuera moléculas lipofílicas o anfipáticas. Algunas son empleadas por los productores de antibióticos para expulsar los antibióticos de forma más rápida de lo que son sintetizados y constituyen, por tanto, un sistema de inmunidad o protección para evitar que la bacteria muera por sus propios venenos.

Según se ilustra en la **figura 24a**, el fármaco es expulsado al exterior de una forma más rápida de lo que puede difundir hacia el interior, de esta forma las concentraciones dentro de la bacteria se mantienen bajas e inefectivas.

Las bombas de eflujo de antibióticos pueden clasificarse en seis familias atendiendo a la fuente de energía que utilizan, su número de componentes estructurales o la naturaleza del compuesto bombeado: la superfamilia ABC (ATP-Binding Cassette), superfamilia MFS (Major Facilitator Superfamily), familia MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion), familia SMR (Small Multidrug Resistance), superfamilia RND (Resistance-Nodulation-Division) y la superfamilia DMT (Drug Metabolite Transporter).

Muchos de los sistemas de bombeo no son específicos para antibióticos, sino que pueden expulsar diferentes compuestos tóxicos, lo que genera una resistencia a un amplio espectro de antibióticos. Así, destaca la presencia de la bomba de resistencia múltiple YhaQ en cepas uropatógenicas de *E. coli* contribuyendo a la resistencia de las bacterias cuando se encuentran formando un biofilm. Otro ejemplo es el sistema AcrAB-ToIC, también de *E. coli*, capaz de solubilizar numerosos tipos de drogas. Sin embargo, otros sistemas son muy específicos y, de forma destacable, son activados por la presencia del antibiótico. Por ejemplo, la bomba de eflujo TetA es selectiva para antibióticos de la familia de las tetraciclinas por transporte activo secundario acoplado a la entrada de protones. La expresión del gen TetA es regulada de forma negativa por TetR, un regulador que es sensible a tetraciclina.

#### **5.4.2. Destrucción del antibiótico**

El ejemplo clásico es la desactivación por hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico en las penicilinas y cefalosporinas a través de la elaboración del enzima  $\beta$ -lactamasa por la bacteria resistente fue probablemente el primer mecanismo de resistencia descrito en la literatura científica. Dado que es el anillo  $\beta$ -lactámico la parte funcional, su rotura rinde un producto inactivo que no interacciona con las PBPs.

Tal como aparece en la Figura 16B, las bacterias que producen  $\beta$ -lactamasa secretan la enzima al periplasma para destruir los antibióticos  $\beta$ -lactámicos antes de que puedan alcanzar sus blancos (PBPs) en la membrana citoplasmática. Una sola molécula de  $\beta$ -lactamasa puede hidrolizar 1000 moléculas de penicilina por segundo. Esta enzima trabaja próxima a los límites cinéticos teóricos para una actividad enzimática, siendo considerada una enzima perfecta, dado que sus  $k_{cat}$  y  $K_m$  se aproximan a los límites de difusión de moléculas pequeñas en solución.

Otro ejemplo de hidrólisis podemos verlo en la existencia de esterazas de macrólidos (como la eritromicina). Estos compuestos tienen estructura cíclica gracias a enlaces ésteres, por lo que la destrucción de este tipo de uniones permite la apertura del anillo y la pérdida de la actividad farmacológica asociada. A pesar de no ser un mecanismo común de resistencia, hay evidencias de niveles altos de la esteraza de eritromicina en *E. coli*, cuyos genes se encuentran en elementos genéticos móviles con capacidad de expandirse por la comunidad microbiana. Este tipo de esterazas se han encontrado también en muestras ambientales de *Pseudomonas sp.*

Otras clases de antibióticos, como los aminoglicósidos, son neutralizados por enzimas desactivantes que modifican su estructura a través de la adición de tres tipos de sustituyentes químicos, lo que hace que estos compuestos ya no sean activos en su interacción con el RNA del ribosoma. Como se muestra en la Figura 16C, las enzimas que confieren resistencia a los aminoglicósidos pueden ser adenilil-transferasas, que añaden grupos AMP, fosforil-transferasas, que añaden grupos  $-\text{PO}_3^-$ , o acetil-transferasas, que acetilan los grupos amino de los antibióticos.

A pesar de no ser frecuentes en bacterias patogénicas, existen ejemplos de enzimas redox como TetX, una flavoproteína cuyo gen fue encontrado en transposones móviles de *Bacteroides fragilis*, como mecanismo de resistencia a tetraciclina. El mecanismo deriva de la modificación del estado redox del fármaco mediante una reacción de hidroxilación, que cambia la conformación tridimensional de un sitio de unión de un catión magnesio esencial para su actividad antimicrobiana.

#### **5.4.3. Introducción de cambios en la estructura de la molécula blanco**

Por ejemplo, la resistencia a eritromicina, además de a través de bombas de eflujo, han aparecido bacterias capaces de mono- o dimetilar un residuo específico de adenina, A2058, que se encuentra en el lazo peptidil-transferasa del RNA 23S del ribosoma. Esta modificación es realizada por la enzima Erm, una metil-transferasa; la modificación no afecta a la biosíntesis de proteínas, pero disminuye la afinidad de la eritromicina por el RNA. El mecanismo Erm es la ruta principal de resistencia en los aislados clínicos de *S. aureus* resistentes y

está presente en los organismos productores de eritromicina como un mecanismo de autoinmunidad o autodefensa.

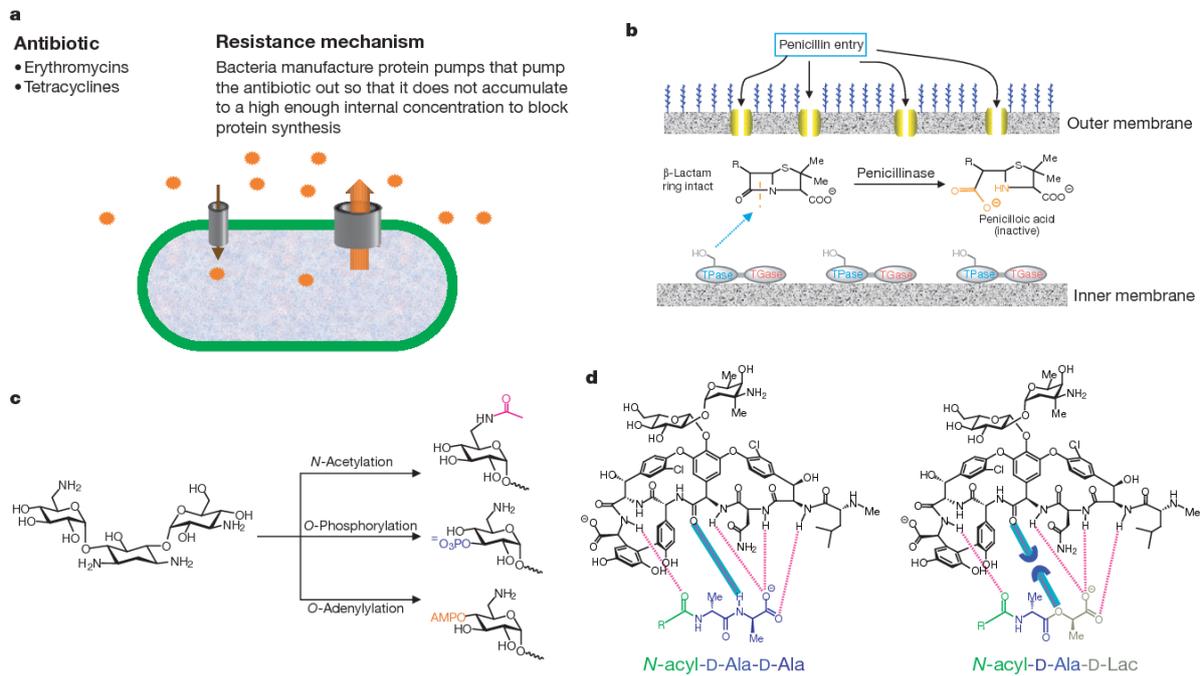
Un ejemplo adicional lo encontramos en los enterococos resistentes a vancomicina (vancomycin-resistant enterococci, VRE). El hecho de que la vancomicina se una a un blanco no proteico que pudiera ser fácilmente mutado, junto a que es efectiva en el exterior de la bacteria y, por tanto, no susceptible a los sistemas de eflujo, hizo pensar que sería difícil que se generara resistencia frente a este antibiótico (**Fig. 25**). Sin embargo, coincidiendo con su masivo uso en clínica, pronto se aislaron VRE, que ahora son causantes de muchas de las infecciones nosocomiales en muchos hospitales. Además, la resistencia a vancomicina ha sido encontrada recientemente en patógenos de gran virulencia como es *S. aureus* (VRSA), lo que aumenta la magnitud del problema.

El mecanismo de resistencia en VRE y VRSA es elegante e implica a un sistema regulador con dos componentes, VanR y VanS, y cuatro enzimas VanH, VanA, VanX y VanY (**Fig. 25**). Todos ellos forman el denominado operón VanHAX del transposón Tn1546. La presencia de glicopéptidos conduce a la activación de VanS, que se autofosforila, y fosforila a su vez a VanR. Una vez fosforilada la proteína VanR, esta va a aumentar la transcripción de los genes VanH, VanA, VanX y VanY. VanH es una  $\alpha$ -cetoácido reductasa que reduce el piruvato a D-lactato. VanA es el homólogo de la D-Ala-D-Ala ligasa, que produce este componente esencial de la pared celular. Sin embargo, VanA usa preferentemente el sustrato D-Lactato para producir el péptido D-Ala-D-Lactato.

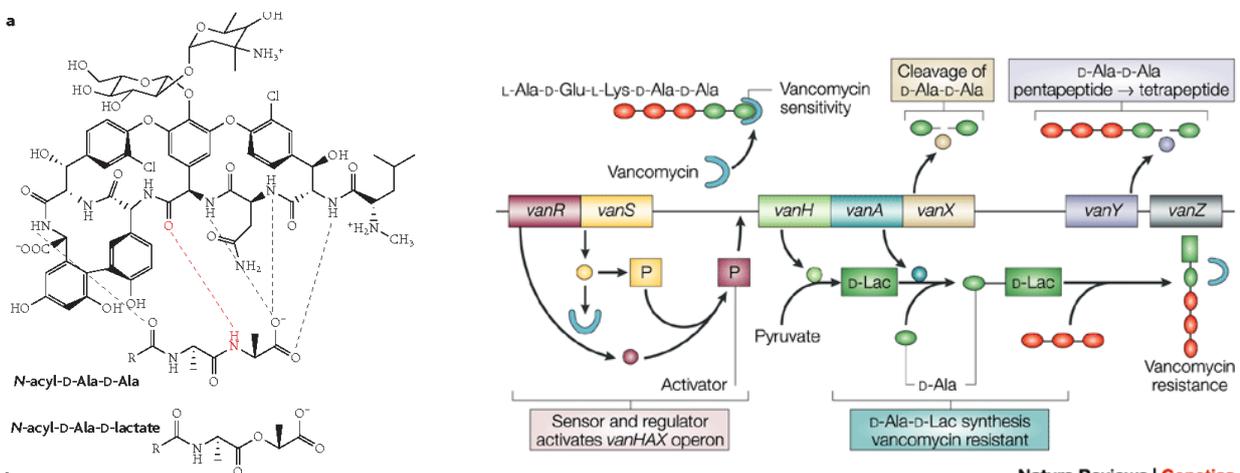
Por otro lado, VanX es una dipeptidasa dependiente de  $Zn^{2+}$ , altamente específica, que destruye la reserva celular de D-Ala-D-Ala. Finalmente, VanY hidroliza la D-Alanina terminal presente en las unidades pentapeptídicas normales. Como resultado, el peptidoglicano de las células resistentes a vancomicina incorpora el éster D-Ala-D-Lactato en lugar del péptido D-Ala-D-Ala (**Fig. 24d**). Este cambio no tiene efecto en la eficacia del sobrecruzamiento realizado por las transpeptidasas PBPs, pero el cambio disminuye la afinidad de unión de vancomicina en unas 1000 veces, lo que permite a los VRE vivir a concentraciones de antibióticos 1000 veces superiores. Esta gran disminución de afinidad se debe a la pérdida de un enlace de hidrógeno y la sustitución de un nitrógeno por un oxígeno que conlleva la aparición de una fuerte repulsión electrostática entre el acilD-Ala-D-Lactato y la vancomicina.

Este mecanismo de resistencia se ha visto que está presente en todas las bacterias productoras de antibióticos glicopeptídicos como la vancomicina. Curiosamente, en algunas bacterias presentes en el medio ambiente, también tienen los genes de resistencia vanHAX aun no produciendo glicopéptidos.

Finalmente, decir que la resistencia a penicilina se puede lograr no sólo a través de la expresión de  $\beta$ -lactamasa, sino también por mutaciones en las PBPs que disminuyen su afinidad por el antibiótico.



**Figura 24. Estrategias principales de resistencia para la supervivencia bacteriana.** **a.** Fármacos, tales como tetraciclinas o eritromicinas, son devueltos al exterior de la bacteria gracias a la acción de bombas de eflujo, con el fin de mantener la concentración intracelular del fármaco por debajo de su nivel terapéutico. **b.** A veces, el antibiótico es destruido por modificación química de su estructura debido a una enzima que es sintetizada por la bacteria resistente. En la figura se ilustra cómo el  $\beta$ -lactamasa es secretada al espacio periplásmico para hidrolizar las moléculas de penicilina antes de que alcancen su blanco molecular (PBPs) en la membrana de las bacterias Gram-negativas. **c.** El antibiótico aminoglicósido kanamicina puede ser modificado enzimáticamente en tres localizaciones diferentes por tres actividades enzimáticas distintas: N-acetilación, O-fosforilación y O-adenilación, con el fin de bloquear su interacción con su diana molecular en el ribosoma. **d.** Además, la estructura de la diana bacteriana puede ser reprogramada para disminuir su afinidad por la molécula de antibiótico. Esta imagen muestra el cambio de un enlace amida en el D-Ala-DAla terminal del peptidoglicano por un enlace éster en el nuevo D-Ala-D-Lac terminal, lo que va acompañado con una reducción de 1000 veces en la afinidad de reconocimiento del antibiótico. *Figura en Walsh (2000).*



**Figura 25. La resistencia a la vancomicina: Un mecanismo elegante de evasión a antibióticos.** **a.** La vancomicina se une al dipéptido N-acil-D-Ala-D-Ala, situado en el extremo de la porción peptídica del peptidoglicano bacteriano, mediante cinco puentes de hidrógeno. Las bacterias resistentes a vancomicina sintetizan peptidoglicanos con N-acil-D-Ala-D-Lactato en su extremo, eliminando una interacción clave en la unión de vancomicina y generando una caída de la afinidad de la misma. **b.** El sistema regulatorio formado por los componentes VanR y VanS regula la resistencia a vancomicina característica de enterococos (vancomycin-resistant enterococci, VRE) y cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (VRSA). *Figura en Hughes (2003).*

### 5.5. Desarrollo de nuevas drogas que eviten la resistencia

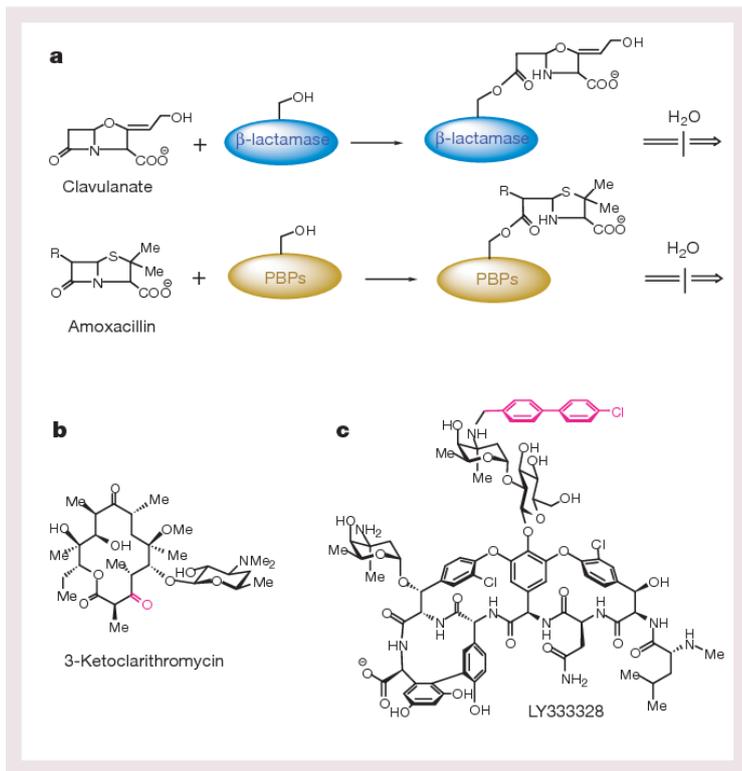
El conocimiento de los mecanismos de resistencia provee de nuevas perspectivas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Históricamente, cuando la resistencia a los antibióticos con anillo  $\beta$ -lactámico apareció, los médicos jugaron con la periferia de dicho anillo para obtener variantes que fueran efectivas. Cuando las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa se constituyeron en una verdadera amenaza clínica, se buscaron aproximaciones para neutralizar esta hidrolasa destructora del antibiótico. Así, se aisló el clavulanato, un producto natural de un estreptomiceto (*Streptomyces clavuligerus*), que no siendo propiamente un antibiótico si es un sustrato suicida para las lactamasas. Por tanto, la presencia del clavulanato permite a la droga clásica amoxicilina (con anillo  $\beta$ -lactamo) tener un mayor rango antibacteriano.

La combinación de clavulanato y amoxicilina se llama augmentine (**Fig. 26a**) y constituye una terapia de primera línea, que se viene utilizando desde hace unos 30 años; desgraciadamente, ya se han detectado algunas cepas bacterianas resistentes. Existen otras combinaciones de inhibidores de  $\beta$ -lactamasas y antibióticos  $\beta$ -lactámicos también ampliamente utilizadas: Unasyn, Timentin, Zocin y Avycaz, que utilizan otras combinaciones de antibióticos e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.

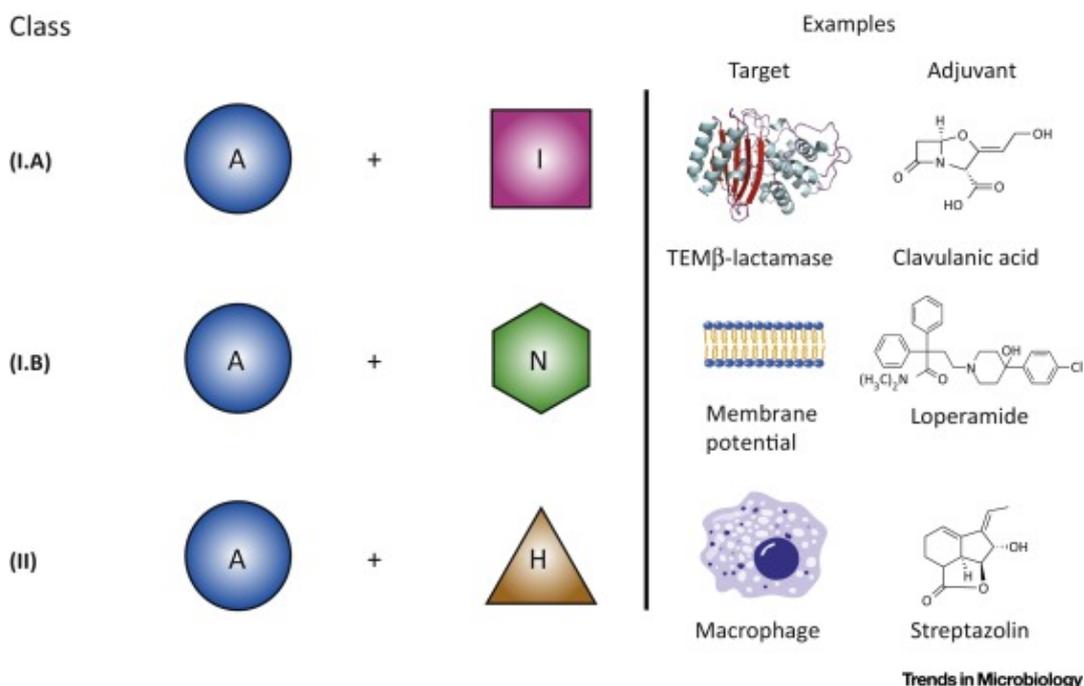
Siguiendo la misma lógica se han buscado o diseñado análogos de tetraciclinas y eritromicinas que son menos susceptibles de ser expulsadas por las bombas de eflujo. Por ejemplo, en la **figura 26b** se muestra una forma de eritromicinas, de tercera generación que, además, es menos propensa a inducir la resistencia por metilación debido a la acción de Erm.

También se han desarrollado inhibidores de quinasas de aminoglicósidos, que son enzimas presentes en bacterias resistentes a aminoglicósidos y que se encargan de modificar químicamente a esos antibióticos, inactivándolos. Estos inhibidores, administrados en combinación con los antibióticos, rescatan la sensibilidad del antibiótico en estas cepas resistentes.

En su conjunto, a este tipo de moléculas se les conoce como adyuvantes (**Fig. 27**) de antibióticos. Otro grupo de adyuvantes de antibióticos son aquellos que actúan modificando las características fisicoquímicas de las membranas de las bacterias patógenas, interfiriendo así con los mecanismos de expulsión de los antibióticos, que es un mecanismo general de resistencia observado en muchos casos.



**Figura 26. Nuevas estrategias en el diseño de fármacos contra la resistencia bacteriana. a.** Augmentine es una combinación de clavulanato, cuya acción es inactivar a las  $\beta$ -lactamasas mediante la formación de un intermedio acil-enzima de hidrólisis muy lenta, y amoxicilina, que bloquea la transpeptidasa que genera el entrecruzamiento de la pared bacteriana por la formación de otro intermedio covalente con la enzima, también de hidrólisis muy lenta. **b.** Para hacer a los fármacos menos susceptibles de ser reconocidos y expulsados por bombas de eflujo, se procedió al diseño de fármacos análogos a los existentes. Así se ilustra el ejemplo de las cetólidos, como la 3-cetoclaritromicina, una eritromicina de tercera generación formada por la introducción del grupo 3-ceto en el anillo macrólido alterando la conformación de la macrolactona. Esto altera su susceptibilidad a ser expulsado por bombas, además de generar resistencia a la modificación por la maquinaria de metilación. *Figura en Walsh (2000)*



**Figura 27. Los adyuvantes pueden ser divididos en dos clases.** Los adyuvantes de clase 1.A inhiben la resistencia activa o intrínseca frente a antibióticos de la bacteria, mientras que los de clase 2 aumentan la capacidad del huésped de eliminar las bacterias. Los de clase 1 se pueden subdividir en clase 1.A que inhiben un mecanismo de resistencia activo, como son las enzimas desactivantes, mecanismos de eflujo, etc., y los de clase 1.B, que son adyuvantes no-antibióticos que bloquean mecanismos pasivos o intrínsecos, como barreras de permeabilidad, biofilms, etc. *Figura en Wright (2016)*

Así, por ejemplo, la loperamida se ha visto que actúa disminuyendo el potencial de membrana de las bacterias Gram-negativas. Para contrarrestar este efecto y mantener la síntesis de ATP, las bacterias aumentan el gradiente de protones de la membrana interna. El aumento en  $\Delta\text{pH}$ , como consecuencia, produce un incremento en la entrada de tetraciclina, contrarrestando la resistencia intrínseca al antibiótico.

El gran avance de las herramientas bioinformáticas ha posibilitado incluir en el diseño y desarrollo de nuevos antibióticos las técnicas de "High Throughput Screening", donde se analizan colecciones de moléculas que se encuentran en la naturaleza y se estudia su potencial carácter microbicida. Además, avances en el campo de la Genómica han permitido conocer con alto nivel de detalle los genomas de los patógenos humanos.

Esto ha permitido una novedosa aproximación para combatir las infecciones: el uso de oligonucleótidos antisentido (ASO, del inglés antisense oligonucleotide) que tienen como diana el mRNA que codifica para enzimas que forman parte de rutas metabólicas esenciales para la supervivencia del microorganismo, o que codifican para factores de virulencia. Así, es un campo en auge en el desarrollo de nuevos antibióticos, donde se estudian dianas y porcentajes de inhibición efectivos, además de metodologías específicas de entrega del oligonucleótido

#### 5.6. Origen y evolución de los genes de resistencia

Al tratar del tema de la resistencia a antibióticos, una cuestión que con frecuencia surge está relacionada con el origen de los genes de resistencia.

Los estudios sobre estructura y función de las proteínas implicadas en resistencia muestran que éstas tienen características comunes con proteínas que no tienen la función de resistencia. Así, se piensa que las proteínas de resistencia han evolucionado a partir de precursores ancestrales que tenían poca o nula afinidad por los antibióticos. Además, hay que tener en cuenta que los antibióticos no existen sólo desde que se descubrieron (hace 60-70 años), sino que probablemente llevan estando en contacto con las poblaciones bacterianas durante millones de años. Por ejemplo, se han estimado que las rutas biosintéticas para eritromicina, estreptomicina y vancomicina se originaron hace unos 880, 610 y 240 millones de años, respectivamente. Así, la existencia en el ambiente durante tanto tiempo de las moléculas antibióticas actúa de fuerza de selección para el crecimiento de cepas resistentes.

Por otro lado, los genes de resistencia a antibióticos más eficientes están presentes precisamente en las bacterias que producen los antibióticos. Los genes de resistencia en estos organismos se encuentran frecuentemente agrupados, y son co-regulados, junto a los genes para la biosíntesis de los antibióticos. Por tanto, las bacterias productoras de antibióticos son reservorios de genes de resistencia de alta especificidad.

Un ejemplo bien caracterizado lo constituye la aminoglicósido quinasa (APH). Esta enzima está encargada de modificar al antibiótico estreptomicina durante su biosíntesis, lo que protege al organismo productor del suicidio. Después una fosfatasa se encarga de retirar el grupo protector, una vez que el antibiótico ha sido liberado al exterior de las células. Ortólogos de la APH se encuentran frecuentemente en transposones, integrones y plásmidos-R de bacterias resistentes.

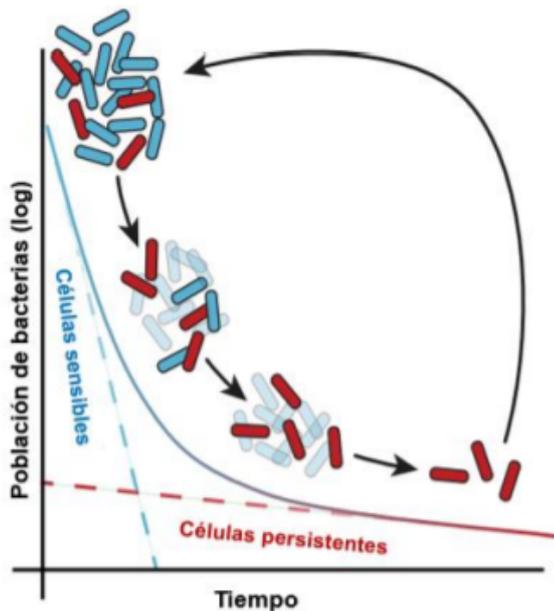
### 5.7. Persistencia bacteriana como mecanismo de resistencia a antibióticos

Muchos pacientes sufren infecciones que resultan difícil de combatir como consecuencia de los mecanismos innatos de las bacterias para establecer persistencia. Este fenómeno, que conduce a la aparición de células especializadas, denominadas persistentes, que van a evitar la presión selectiva de antibióticos (y otros tipos de estrés) mediante el establecimiento en un estado fisiológico “durmiente” (donde se produce un bloqueo prácticamente total del crecimiento bacteriano, reduciendo su actividad metabólica), aunque no posean genes de resistencia antibióticos. Y van a ser causa de reactivación de la infección cuando salen de ese estado y reanudan el crecimiento.

Precisamente la existencia de bacterias persistentes se puso de manifiesto en ensayos con antibióticos bactericidas. Así, cuando un cultivo bacteriano es expuesto a un antibiótico, se produce una rápida disminución en el contaje de bacterias como consecuencia de la muerte de la mayoría de la población, pero con frecuencia algunas de estas bacterias establecen el estado de persistencia, donde no son afectadas por el antibiótico, y serán capaces de generar una nueva población cuando se pongan en un medio carente de antibiótico (**Fig. 28**).

Esta capacidad de las bacterias hace que en muchos pacientes desarrollen lo que se denomina “infecciones incurables”, ya que las personas que las sufren experimentan infecciones recurrentes a pesar de ser tratadas repetidamente con distintos antibióticos. Las bacterias persistentes se van a acantonar en determinados nichos celulares o formando asociaciones de biofilms. Ejemplos clínicos de este tipo de infecciones lo constituyen las cepas uropatogénicas de *Escherichia coli*, las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, y las infecciones oportunistas de implantes quirúrgicos, heridas u otras lesiones causadas por biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*.

La capacidad de establecer persistencia es variable entre las distintas cepas y especies de bacterias. La aparición de las células persistentes parece ser el resultado de una combinación de procesos estocásticos y mecanismos específicos que parecen responder a señales de estrés. Esto implica que algunas células persistentes se establecerían antes del tratamiento con antibióticos



**Figura 28. Cinética bifásica de la muerte bacteriana tras el uso de un tratamiento bactericida.** La adición de una dosis letal de un antibiótico bactericida a tiempo 0 erradica de manera rápida la población bacteriana sensible a dicho fármaco (azul) hasta que únicamente persisten un pequeño porcentaje de bacterias persistentes (rojas) cuya muerte es más lenta. Al finalizar el tratamiento, la población de bacterias puede ser repuesta gracias a la reactivación de las bacterias persistentes remanentes en el medio. *Figura en Harms et al. (2016).*

La persistencia bacteriana o estado de latencia que adoptan las bacterias es un mecanismo de defensa de las mismas, mediante el cual van a intentar evitar su muerte. Este mecanismo ha sido útil en la evolución de las bacterias porque permite a la población volver a repoblar el hábitat después de eventos catastróficos que pueda sufrir.

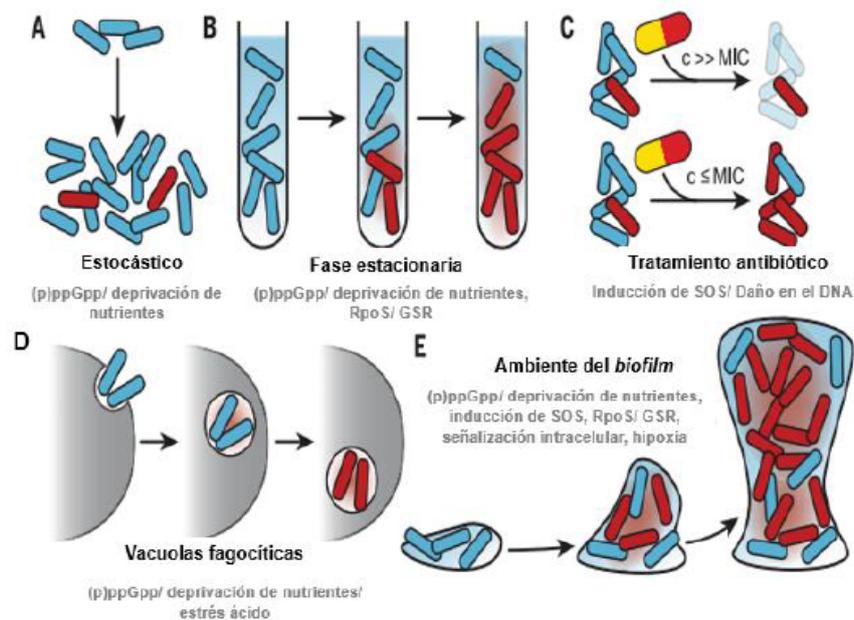
Tanto los procesos estocásticos como las condiciones ambientales que puedan inducir a estrés a dicha bacteria (cambios de temperatura, de pH, biofilms, concentraciones subletales de antibióticos, fagocitosis, etc.) van a poner en marcha unos mecanismos de señalización intracelular mediante los cuales la bacteria va a ser capaz de adoptar ese estado de latencia (**Fig. 29**).

Estas vías de señalización intracelular que van a permitir y controlar la formación del estado de latencia son principalmente las siguientes: la señalización del segundo mensajero (p)ppGpp que forma parte integral de casi todas las formaciones de persistencia, la respuesta de estrés general, la respuesta SOS, la señalización de la hipoxia o los niveles de di-GMP cíclico, estos últimos tienen sobre todo funciones moduladoras.

Las señales y mecanismos que controlan la persistencia bacteriana están codificados genéticamente. A parte de los problemas con la tolerancia a antibióticos, la persistencia bacteriana también se ha descrito como un “catalizador” para la aparición de resistencia genética porque se sabe que las diferentes vías de señalización del estrés que suelen participar en la formación de persistencia bacteriana aumentan la tasa de mutación y activan transposones.

De manera un poco más detallada se explican algunas características de las rutas de señalización que favorecen el estado de latencia:

- En la vía de señalización de la respuesta general a estrés cabe destacar el factor regulador sigma RpoS, que además de regular la persistencia bacteriana, también mejora la tolerancia al estrés de la bacteria.
- La respuesta SOS: tiene una función doble en la persistencia bacteriana, es una vía complementaria de señalización y puede proveer de diversas funciones de reparación del DNA que son importantes para la reanimación después de la persistencia, cuando la bacteria ya no esté en peligro.
- De la señalización a partir del segundo mensajero (p)ppGpp cabe destacar que aparte de ser la vía de señalización principal que permite la activación de la persistencia se han realizado estudios experimentales en los que mutantes de bacterias incapaces de producir este mensajero ha conducido a esas bacterias a tener menor capacidad para producir persistencia.



**Figura 29: Las señales ambientales y celulares que subyacen a la formación de persistencia bacteriana:** Más allá de una base estocástica en la formación de persistentes (A), diferentes señales ambientales activan la señalización bacteriana para inducir la formación de células de persistencia (rojo) a partir de crecimiento regular (azul). Por ejemplo, la transición a la persistencia bacteriana es inducida fuertemente por la fase estacionaria (B), el tratamiento con dosis subletales de antibióticos (C) y la fagocitosis por las células del sistema inmunitario (D), así como su asociación en las biopelículas (E). GSR: respuesta general al estrés; MIC: concentración mínima inhibitoria. *Modificada a partir de la figura en Harms et al. (2016)*

Otro grupo importante de mecanismos de activación de persistencia bacteriana está mediado por los sistemas toxina-antitoxina. Estos sistemas están conformados por dos proteínas que tienen acciones contrarias. La toxina interviene en procesos celulares esenciales y de esta manera inhibe crecimiento bacteriano mientras que la antitoxina perjudica la actividad de la toxina hasta que se suprime la inhibición que la toxina podría crear.

Hay diversos tipos de sistemas toxina-antitoxina, pero únicamente los de tipo I y II son los que se han visto que estén relacionados con el mecanismo de persistencia bacteriana.

- Tipo I: las toxinas suelen ser proteínas pequeñas que forman poros en la membrana para colapsar la función de la ATPasa y detener la síntesis de ATP. Las antitoxinas de este grupo inhiben la expresión de las toxinas como RNAs antisentido.
- Tipo II: las toxinas de este grupo tienen actividades muy diversas pero la mayoría son inhibidores de la traducción. Las antitoxinas son proteínas que inactivan sus toxinas afines mediante interacción proteína-proteína.

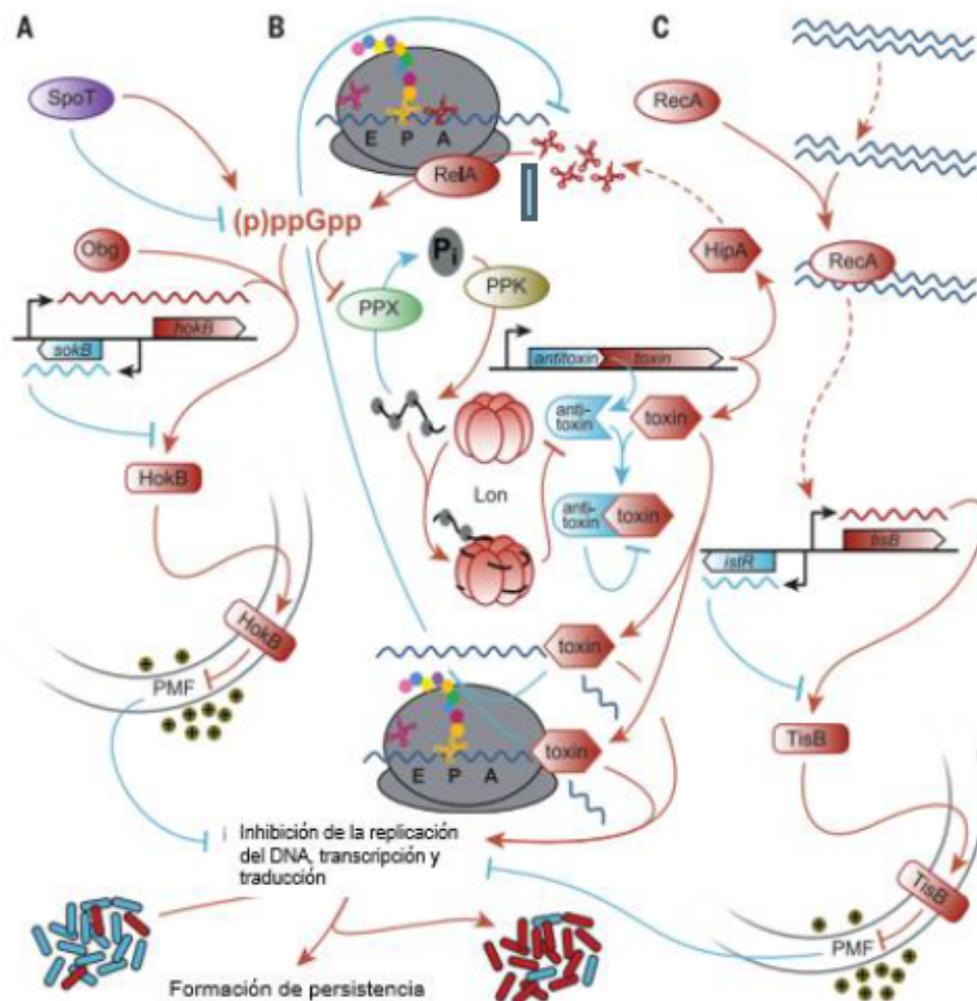
Este sistema suele estar controlado por una combinación de regulación transcripcional y postranscripcional. Dependiendo de cómo sea la activación de estos módulos de T-A los efectos que van a crear en las células bacterianas van a ser diferentes. Si se activan de manera gradual no se anula completamente el crecimiento bacteriano de manera que esto permite o un ajuste de tasas de crecimiento o mejorar la fisiología para tolerar mejor el estrés. Sin embargo, si estos módulos se activan forzosamente es cuando se causa una brutal inhibición del crecimiento bacteriano, esto coincide con un aumento a la tolerancia de los antibióticos demostrando que los sistemas T-A están ligados con el fenómeno de persistencia bacteriana.

En el modelo de *E.coli* *k-12* los módulos de toxina-antitoxina que favorecen la persistencia han sido más estudiados. De todo el conjunto de módulos T-A, tanto del tipo I como del tipo II, la mayoría de ellos están implicados en las tres vías de persistencia principales que existen en este organismo (Fig. 30) y que se detallan a continuación:

- Endonucleasas de mRNA de tipo II T-A bajo el control de (p)ppGpp, polifosfato y Lon (proteasa): esta vía se desencadena en células que contienen altos niveles de (p)ppGpp, la alarmona a su vez causa la acumulación de polifosfato lo que hace que la proteasa Lon degrade la antitoxina HipB de estos módulos T-A implicados y por ello la toxina HipA puede actuar inhibiendo un proceso celular que conlleva a una síntesis de alarmona dependiente de RecA. Este proceso genera un bucle de retroalimentación positiva que causa una activación sostenida de las mRNA endonucleasas y de HipA. Esta activación sostenida a su vez inhibe la traducción global y por lo tanto induce la formación de persistencia.
- La respuesta SOS y los módulos de TA regulados por SOS: la respuesta SOS que además de inducir la reparación del DNA para que la bacteria sobreviva también es capaz de controlar la activación de módulos T-A, principalmente la vía del TisB. TisB es una toxina que forma poros en la membrana causando la inhibición de la síntesis del ATP, lo que conduce a la formación de bacterias persistentes

- La toxina HokB bajo el control de Obg y (p)ppGpp: Obg es una GTPasa capaz de determinar la proporción de células persistentes en la población. Esto lo hace mediante la producción de alarmona, lo que provoca un aumento de la toxina de tipo I HokB, que va a alterar la producción de ATP mediante la formación de poros en la membrana, favoreciendo esa persistencia bacteriana.

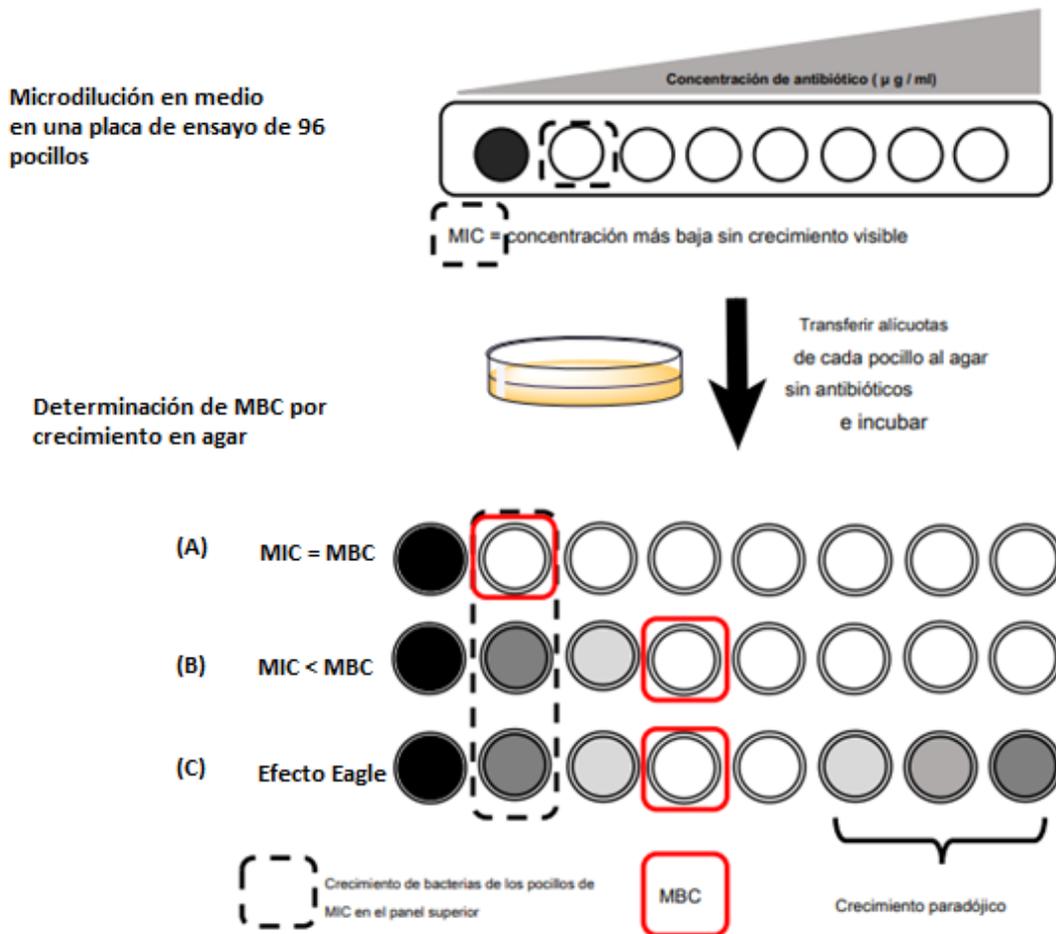
De este modo, las toxinas de tipo I HokB y TisB inducen la formación de persistencia al abolir la fuerza motriz de los protones, mientras que las toxinas de tipo II de mRNA de endonucleasa interfieren con la traducción ribosómica.



**Figura 30: Módulos de toxina y antitoxina y formación de persistencia en E.coli.** Se presentan en detalle tres vías principales de formación de persistencias en E.coli K-12 que dependen de la activación de los módulos de toxina y antitoxina (TA), con mecanismos que promueven y contrarrestan la formación de persistencias que se muestran en rojo y azul, respectivamente. La vía del Obg/HokB (A) y la vía de la polifosfato/Lon/mRNA interferasa (B) están bajo el control de la señalización (p)ppGpp, mientras que la vía del TisB (C) se activa mediante una fuerte inducción de SOS. Las toxinas de tipo I HokB y TisB inducen la formación de persistencia al abolir la fuerza motriz de los protones (PMF) como péptidos asociados a la membrana, mientras que las 10 toxinas de tipo II (endonucleasas de mRNA) interfieren con la traducción ribosómica. Obsérvese que esta última vía implica tanto una retroalimentación positiva (vía HipA) como una retroalimentación negativa (por la caída de los niveles de mRNA). E,P y A denotan los sitios de salida, peptidil y aminoacil tRNA del ribosoma respectivamente; Pi, fosfato inorgánico. *Modificada partir de la figura en Harms et al. (2016).*

## 5.8 El efecto Eagle

El efecto Eagle que Harry Eagle en 1948 observó estudiando la actividad bactericida de la penicilina en cultivos, se ha detectado en hongos y bacterias tanto bacterias Gram-negativas como Gram-positivas. Se hablará del efecto Eagle en las bacterias.



**Figura 31: Ilustración del efecto Eagle detectado en un ensayo de determinación de la concentración bactericida mínima (MBC).**

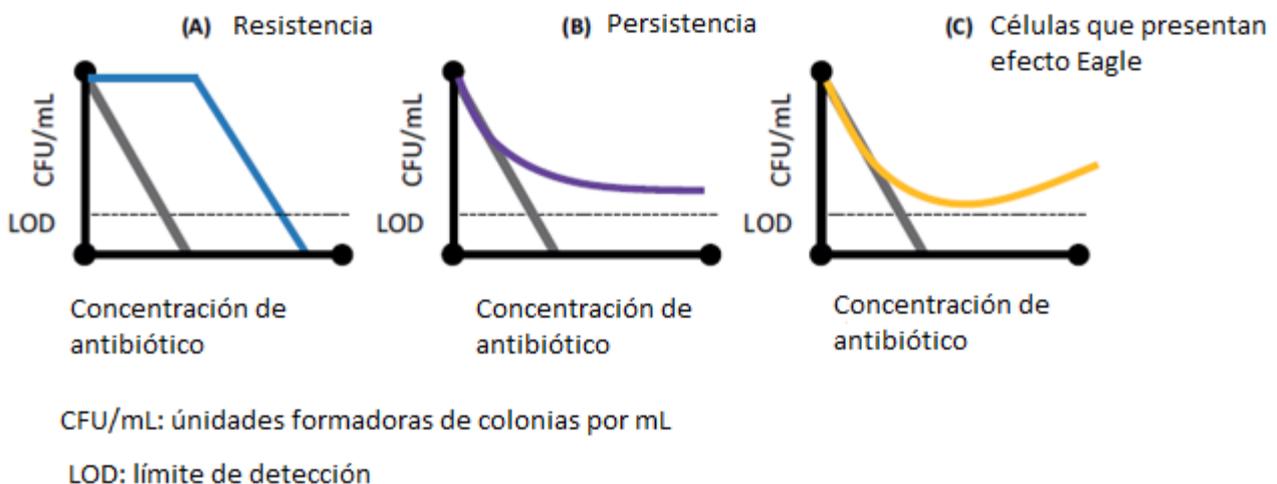
**Parte superior:** Una fila de muestras de un ensayo de determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) en una placa de 96 pocillos. El sombreado representa el crecimiento bacteriano visible (turbidez) en los pocillos de la placa. La MIC es la concentración más baja de antibiótico que previene el crecimiento visible de bacterias (detectado por observación visual o midiendo la DO a 600 nm). El efecto Eagle no es detectable mediante el ensayo de MIC solo.

**Parte inferior:** Posibles resultados con antibióticos bactericidas en un ensayo de MBC de microdilución. El sombreado representa la densidad de crecimiento bacteriano (colonias) en las placas de agar, con una intensidad creciente que ilustra una mayor densidad bacteriana. (A) El MBC puede ser igual al MIC o (B) el MBC puede ser más alto que el MIC (C) Se dice que el efecto Eagle se produce cuando hay un crecimiento paradójico de un número mayor de bacterias en muestras expuestas a concentraciones de antibióticos superiores al MBC. *Modificada a partir de la figura en Prasetyoputri et al. (2019).*

Este efecto describe que tanto las bacterias que son expuestas a concentraciones superiores que la concentración bactericida óptima, tienen mayores niveles de supervivencia que si fueran expuestos concretamente a esa concentración óptima, lo que resulta algo paradójico y desconcertante. Para entender mejor este fenómeno, es preciso explicar cómo se realizan los ensayos de sensibilidad a antibióticos (**Fig. 31**). Una suspensión bacteriana es repartida en los pocillos de una placa de cultivo, en cada pocillo se añade una concentración creciente de antibiótico. Después de un tiempo de incubación, se procede a enumerar el número de bacterias supervivientes mediante plaqueo en medio con agar libre de antibiótico.

En estos ensayos de sensibilidad a antibióticos realizados para demostrar la existencia del efecto Eagle nos podemos encontrar con que la MBC/CBM o concentración bactericida mínima, que se define como la concentración mínima de antibiótico requerida para matar a más del 99,9% de las bacterias, puede ser igual que la MIC o concentración mínima inhibitoria que conduce a una inhibición del crecimiento, determinada de una forma visual (**Fig. 31a**). También puede pasar que MBC sea varias diluciones superiores que MIC (**Fig. 31b**). Sin embargo, Eagle encontró que, en algunas cepas de bacterias, aumentando la concentración del antibiótico por encima del valor MBC, paradójicamente, el número de bacterias supervivientes era mayor.

El efecto Eagle varía de un antibiótico a otro y solo se observa en algunas combinaciones de antibióticos y bacterias. El efecto Eagle se asemeja al fenómeno de persistencia bacteriana a algunos elementos de persistencia bacteriana, pero tienen una serie de atributos distintivos (**Fig. 32**).



**Figura 32: Representación de la concentración de antibióticos frente CFU/mL en (A) Resistencia, (B) Persistencia y (C) Células que presentan el Efecto Eagle. Modificada a partir de la figura en Prasetyoputri et al. (2019).**

En la **Figura 32** se muestra más detalladamente esa diferencia que existe entre el fenómeno de persistencia y efecto Eagle y además también se compara con una población de bacterias resistentes:

- Las bacterias que puedan adquirir resistencia mediante la adquisición de mutaciones o por mutaciones que tuvieran ya preexistentes son capaces de crecer en presencia de antibióticos y por tanto para tener una menor cantidad de CFU (unidades formadoras de colonias) se necesitaría suministrar una mayor cantidad de antibiótico (**Fig. 32a**).
- En el segundo gráfico se ilustra el fenómeno de persistencia bacteriana, donde se puede observar que una subpoblación de bacterias es capaz de resistir frente a concentraciones letales de antibióticos, mientras que a esas concentraciones la mayoría de bacterias ya sean susceptibles o resistentes van a morir (**Fig. 32b**).
- En el gráfico correspondiente al efecto Eagle, se observa que el número de bacterias inicialmente se reduce de la misma manera que lo hacen las bacterias persistentes, pero también se ve que a concentraciones mucho más altas de antibióticos sobreviven bastantes, mientras que las persistentes ya no son capaces de sobrevivir a esas concentraciones tan altas (**Fig. 32c**).

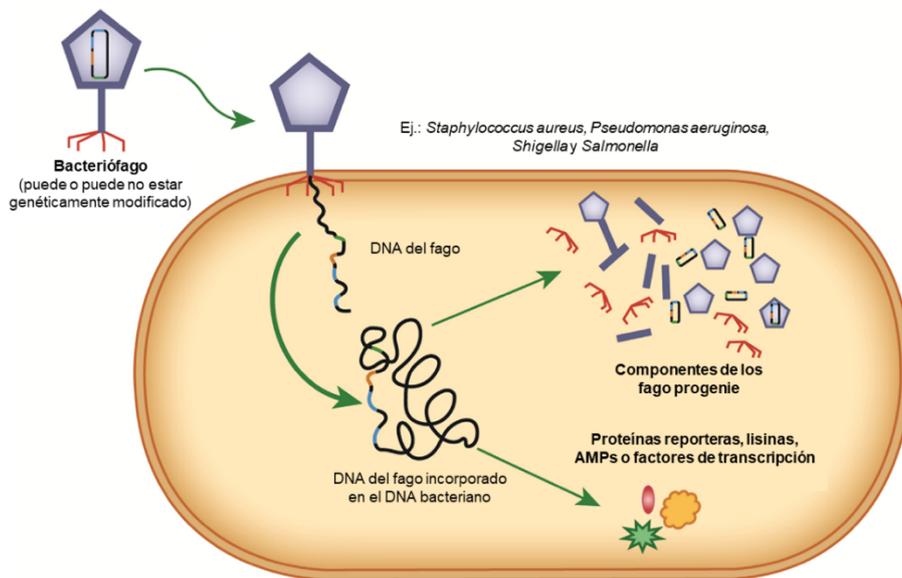
## 6. ALTERNATIVAS A LOS ANTIBIÓTICOS EN LA ERA DE LOS MICROBIOS RESISTENTES

Actualmente, se estima que cada año, unas 700.000 personas mueren por infecciones causadas por microorganismos resistentes a antibióticos. Pero el problema irá en aumento, y para el 2050 se piensa que el número de muertes causadas por bacterias insensibles a los antibióticos podría ser de 10 millones. Es por ello, que alternativas a los antibióticos convencionales son una necesidad urgente.

- **Terapia basada en bacteriófagos:**

La terapia con bacteriófagos se empezó a utilizar inicialmente para el tratamiento de infecciones bacterianas en granjas de producción animal. Actualmente, ya existen bacteriófagos aprobados para el uso en humanos para combatir infecciones con *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* y *Salmonella*.

Se trata de utilizar fagos específicos de bacterias patogénicas, pero que no tengan efecto sobre las bacterias comensales. Además de provocar la lisis de las bacterias blanco, el genoma de los fagos podría ser modificado para que la bacteria exprese péptidos antimicrobianos, lisinas u otras moléculas que contribuyan a potenciar la respuesta frente a los microorganismos patógenos (**Fig. 33**).



**Figura 33. Terapia con bacteriófagos.** La figura muestra el funcionamiento de la terapia empleando bacteriófagos naturales o genéticamente modificados que van a atacar selectivamente a bacterias concretas (ej: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Shigella* y *Salmonella*). El genoma del fago se integrará en el genoma bacteriano desde donde se replica y expresa usando la maquinaria del hospedador. Los componentes se ensamblan en fagos progenie que lisarán la bacteria a su salida. También se puede modificar genéticamente a estos fagos para que expresen proteínas reporteras, lisinas, péptidos antimicrobianos (ATMs) o factores de transcripción que dañen a la bacteria. *Modificada a partir de la figura en Gosh et al. (2019).*

- Terapia basada en péptidos antimicrobianos:

Otra terapia antimicrobiana es la basada en el empleo de péptidos antimicrobianos específicos con capacidad de afectar la membrana de bacterias patógenas. Si bien, hasta ahora ninguno ha progresado desde los ensayos clínicos a la clínica.

Estos péptidos antimicrobianos son producidos por muchos organismos multicelulares para evitar la invasión por patógenos o promover una respuesta inmunitaria innata. La mayoría de ellos tiene un dominio catiónico, que interacciona electrostáticamente con la superficie bacteriana negativamente cargada y en muchos casos provoca la ruptura de la membrana. Sin embargo, nuestras membranas plasmáticas no son blanco de estas moléculas ya que en general tienen una carga neta relativamente neutra gracias a su naturaleza zwitteriónica.

Estos péptidos antimicrobianos no deben confundirse con los antibióticos peptídicos, que sí se emplean habitualmente en clínica como son: polimixina B (un lipopéptido obtenido de *Bacillus polymyxa*), colistina (=polimixina E; también obtenido de *B. polymyxa*), gramicidina (péptido lineal producido por *Bacillus brevis*) y la daptomicina (un lipopéptido aniónico cíclico).

- Terapias basadas en bacteriocinas:

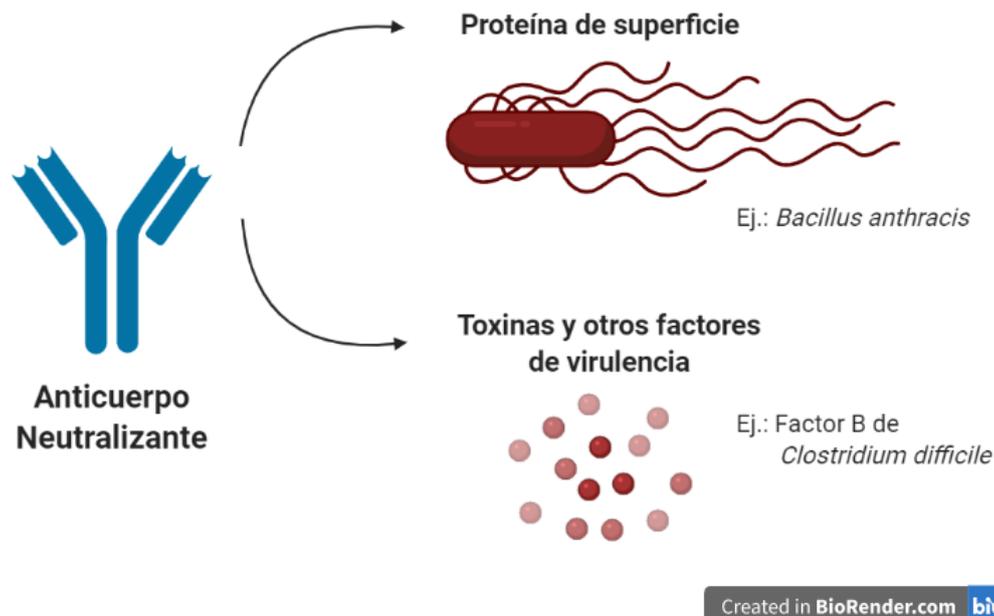
Las bacteriocinas son pequeños péptidos antimicrobianos producidos por bacterias con la finalidad de combatir/competir con otras bacterias con las que comparten nicho. Se ha descubierto que algunas de estas bacteriocinas (que suelen ser muy selectivas) son activas frente a patógenos resistentes de relevancia clínica. Por ejemplo, la bacteriocina turicina (en inglés: *thuricin*) no afecta a las bacterias comensales presentes en el intestino, pero es muy activa frente a *Clostridium difficile*.

Sin embargo, todavía ninguna está actualmente en uso clínico (aunque sí hay algunas que como nisina (en inglés: *nisin*) están autorizadas para el uso en la industria alimentaria).

- Terapias basadas en anticuerpos neutralizantes:

Se ha visto que los anticuerpos también pueden ser utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas intratables con antibióticos. Estos anticuerpos neutralizantes pueden ir dirigidos frente a proteínas de superficie de la bacteria, y bloquear su capacidad de infección; o frente a toxinas u otros factores de virulencia, que son en muchos casos los responsables de la patología (**Fig. 34**).

Actualmente, ya está aprobado el uso de preparaciones de anticuerpos para combatir infecciones con *Bacillus anthracis* o con *Clostridium difficile* (mayoritariamente dirigidos contra su toxina: Factor B). Ahora bien, un gran inconveniente es el alto coste de producción.



**Figura 34. Terapia con anticuerpos neutralizantes.**

Los anticuerpos neutralizantes empleados en el tratamiento de infecciones bacterianas (ej. *Bacillus anthracis* o *Clostridium difficile*) pueden estar dirigidos contra antígenos de superficie, frenando al invasión; o contra toxinas u otros factores de virulencia, que en muchos casos son los causantes de la sintomatología. Creada con BioRender.

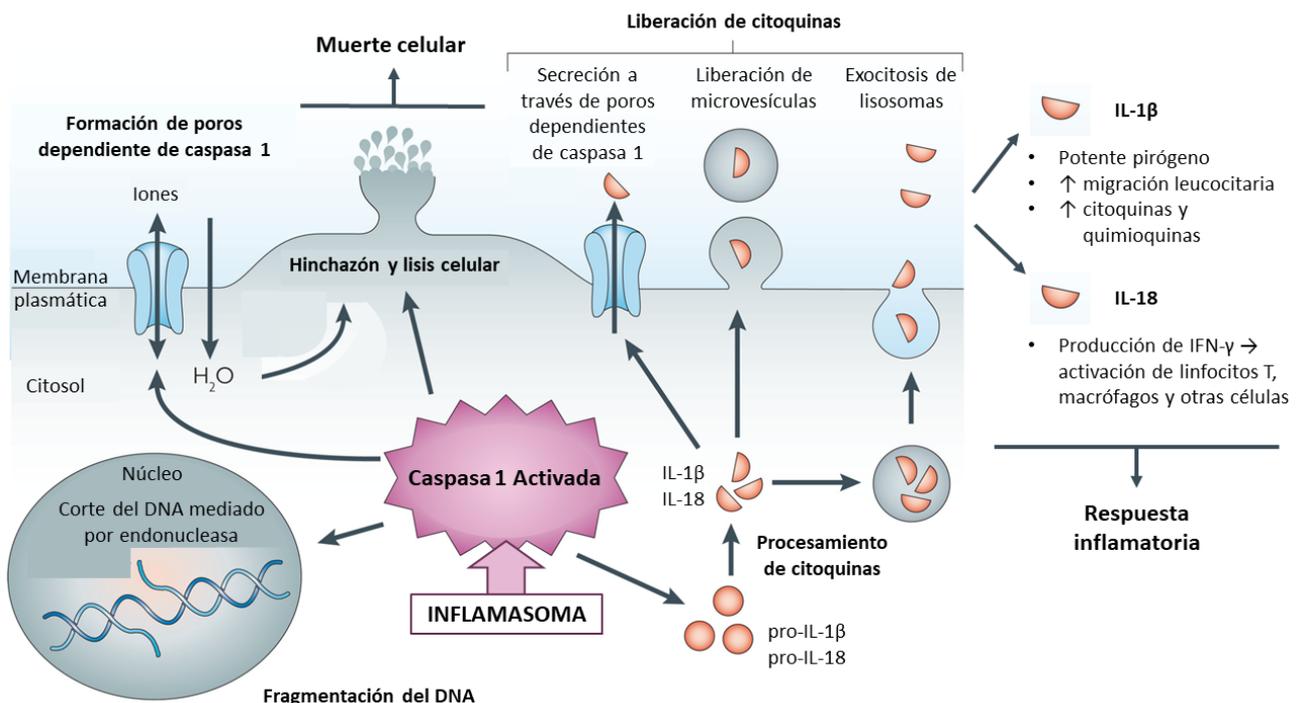
## 7. LA PIROPTOSIS: MECANISMO DE DEFENSA FRENTE A LA INFECCIÓN

La piroptosis, también conocida como muerte celular dependiente de caspasa-1, es una respuesta inherentemente inflamatoria, que resulta crucial para controlar muchas infecciones microbianas.

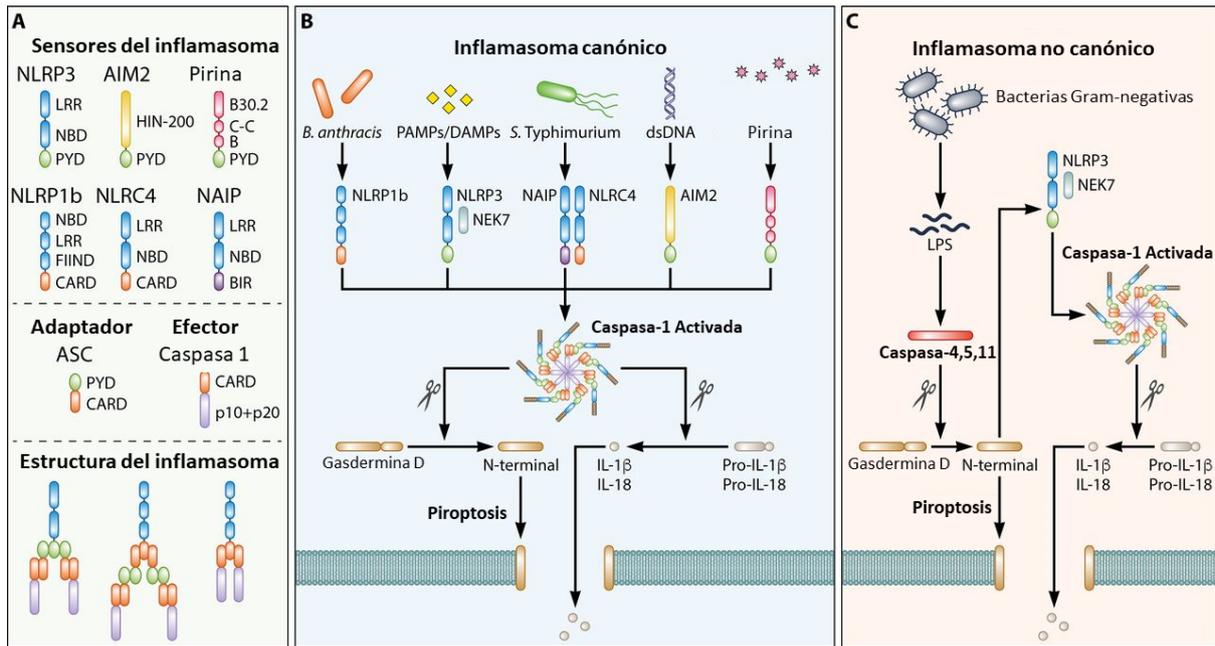
Las células pueden morir a través de distintas vías metabólicas, que producen diferentes resultados morfológicos y fisiológicos. La apoptosis es probablemente el programa de muerte celular más usual, y es llevada a cabo por una serie de proteasas –las caspasas– que van a producir un desensamblaje orquestado de la célula. Las caspasas apoptóticas van a romper varios substratos celulares, desencadenando una serie de efectos como son la condensación nuclear y citoplasmática, y la rotura del DNA; eso sí, la membrana citoplasmática durante la apoptosis se mantiene intacta. Finalmente, los contenidos de las células apoptóticas son empaquetados en “cuerpos apoptóticos”, que van a ser retirados mediante fagocitosis: se trata de un proceso “silencioso”, que no induce respuestas inmunitarias inflamatorias.

Uno de los últimos mecanismos de muerte celular que se ha identificado es la piroptosis, que resulta inducido por diferentes infecciones microbianas (por ejemplo, *Salmonella*, *Francisella* y *Legionella*), pero también por estímulos no infecciosos (por ejemplo, factores celulares liberados durante el infarto de miocardio).

La caspasa 1 se identificó inicialmente como una proteasa que procesa los precursores inactivos de interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-18 en las citoquinas inflamatorias maduras. Posteriormente se ha visto que la caspasa 1 es el enzima que media el proceso de muerte celular conocido como piroptosis (**Fig. 35**).



**Figura 35. Caspasa 1 como coordinadora de la muerte celular por piroptosis.** La formación del inflammasoma (en respuesta a diferentes estímulos) resulta en la activación por proteólisis de la caspasa-1, iniciando un programa conservado de muerte celular llamado piroptosis. La activación de la caspasa-1 tiene tres grandes efectos: 1) Formación de poros en la membrana – esto desestabiliza los gradientes iónicos celulares y provoca una entrada masiva de agua que causa el hinchamiento y finalmente la lisis osmótica de la célula. 2) Rotura del DNA cromosómico – no genera fragmentos oligonucleosomales y se mantiene la integridad nuclear. 3) Procesamiento de citoquinas inflamatorias - los precursores de IL-1 $\beta$  e IL-18 son procesados por la caspasa-1 y liberados por diferentes mecanismos como p.ej.: a través de los poros generados en la membrana, la liberación de microvesículas o vía exocitosis de lisosomas independiente de caspasa-1. Una vez liberadas, estas citoquinas montan una fuerte respuesta inflamatoria. *Modificada a partir de la figura en Bergsbaken et al. (2009).*



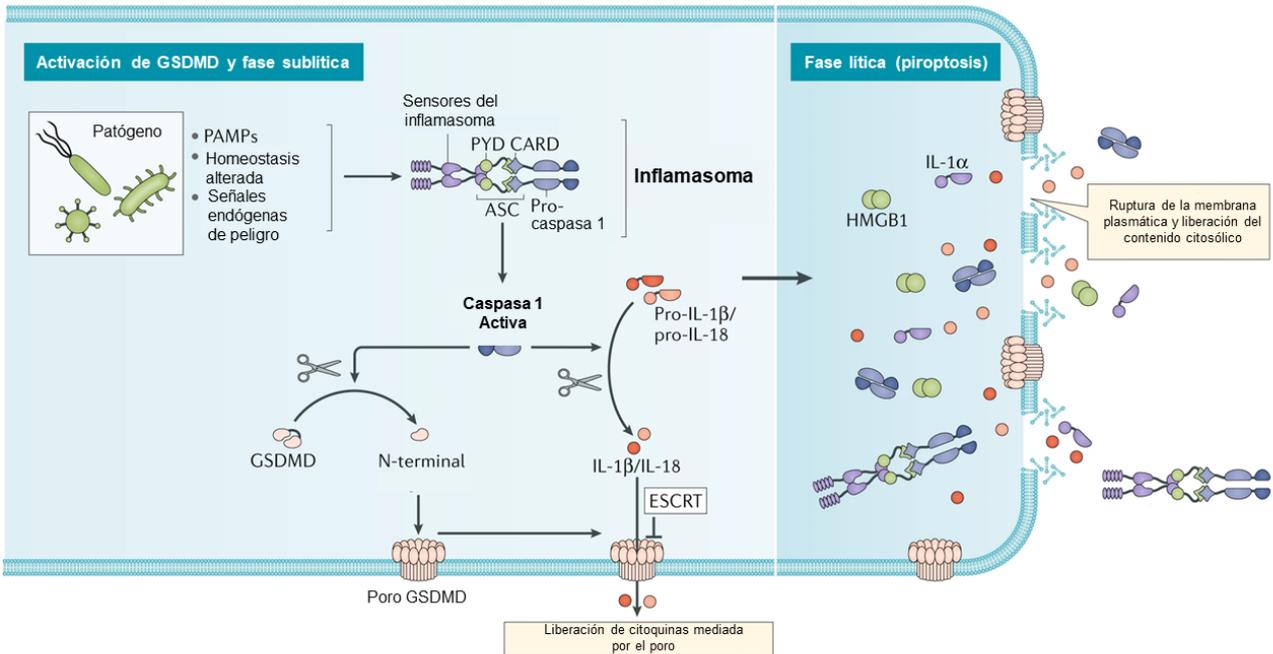
**Figura 36. Estructura de los diferentes complejos del inflammasoma.** Esta figura muestra A) diferentes sensores y demás componentes que forman parte del inflammasoma y diferentes asociaciones que pueden adoptar en función de sus dominios (p.ej. aquellos sensores que no poseen un dominio CARD o *caspase recruitment domain* necesitan de la participación de moléculas adaptadoras). Así mismo retrata esquemáticamente el mecanismo de iniciación de la piroptosis seguido por B) los inflammasomas canónicos y C) los inflammasomas no canónicos, incluyendo diferentes PAMPs y sensores implicados en ambas vías. *Modificada a partir de la figura en Hayward et al. (2018).*

Una vez que se produce la interacción de los sensores intracelulares con las moléculas activadoras PAMPs (del inglés: *Pathogen-associated molecular patterns*) o DAMPs (del inglés: *Danger-associated molecular patterns*), tiene lugar la formación del inflammasoma y la activación de la caspasa 1. Esta caspasa rompe a la proteína formadora de poros gasdermina D, y la parte N-terminal se ensambla en la membrana formando poros (Fig. 36 y 37).

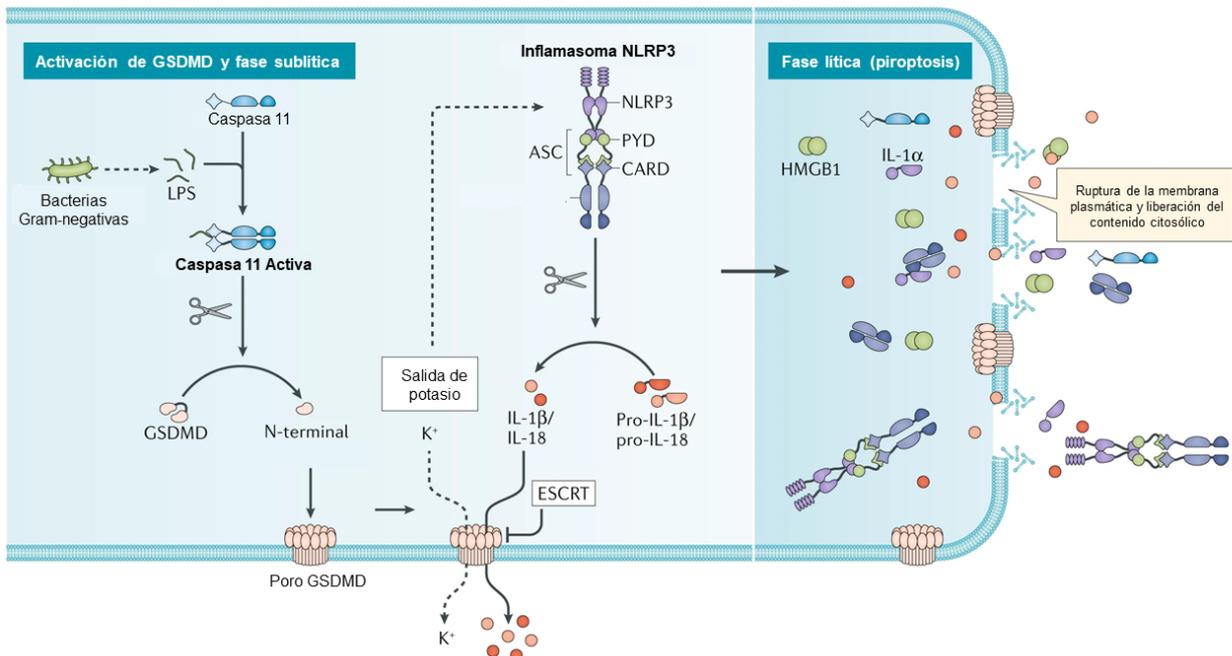
Además del inflammasoma formado por caspasa 1, recientemente se ha identificado un inflammasoma ‘no canónico’ que es activado específicamente por bacterias Gram-negativas, y más concretamente por el lipopolisacárido (LPS). El LPS activa a las caspasas 4 y 5 de humanos y a la caspasa 11 del ratón.

Estas caspasas también rompen a la gasdermina D, activando su capacidad de formar poros y desencadenar la piroptosis: provoca una serie de eventos (ej. un aumento de la salida de  $K^+$ ) que conducen a la activación del inflamasoma NLRP3 y la activación de caspasa 1 (Fig. 36 y 37).

**a Inflamasoma canónico**



**b Inflamasoma no canónico**



**Figura 37. Mecanismo de acción del inflamasoma canónicos y no canónico.** La figura resume un esquema general del proceso de activación de la piroptosis via a) inflamasomas canónicos y b) inflamasomas no canónicos: desde el reconocimiento de PAMPs o DAMPs por los sensores del inflamasoma, pasando por la formación de poros en la membrana y la liberación de citoquinas inflamatorias (activación de gasdermina (GSDMD) y fase sublélica), hasta el desencadenamiento de la lisis osmótica celular (fase lítica). *Modificada a partir de la figura en Broz et al. (2020)*

La activación de la caspasa-1 conduce a una rápida formación de poros en la membrana plasmática, a través de los cuales se va a producir un flujo de iones y una entrada de agua, con lo que la célula se va a hinchar hasta que se lisa (**Fig. 35**).

La caspasa 1 también promueve la rotura del DNA cromosomal, aunque no resulta la generación de fragmentos oligonucleosomales como ocurre durante la apoptosis. En la piroptosis tampoco se observa condensación del núcleo, ni su fragmentación como ocurre durante la apoptosis (**Fig. 35**).

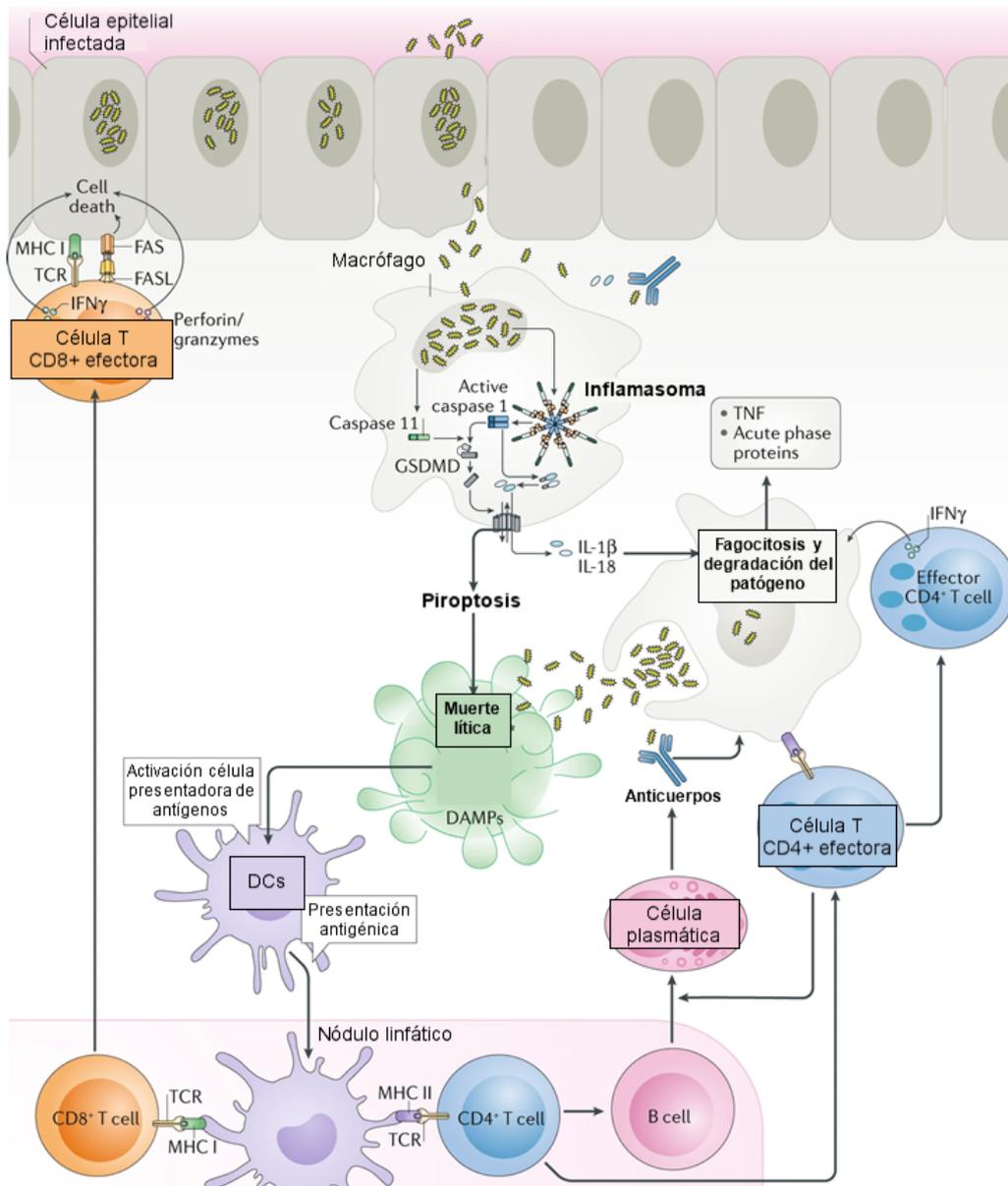
Simultáneamente, los precursores de IL-1 $\beta$  e IL-18 son procesados por la caspasa 1 y liberados durante la piroptosis a través de diversas vías (**Fig. 35**):

- i) a través de los poros formados por la activación de caspasa 1
- ii) liberación de microvesículas
- iii) exocitosis de lisosomas

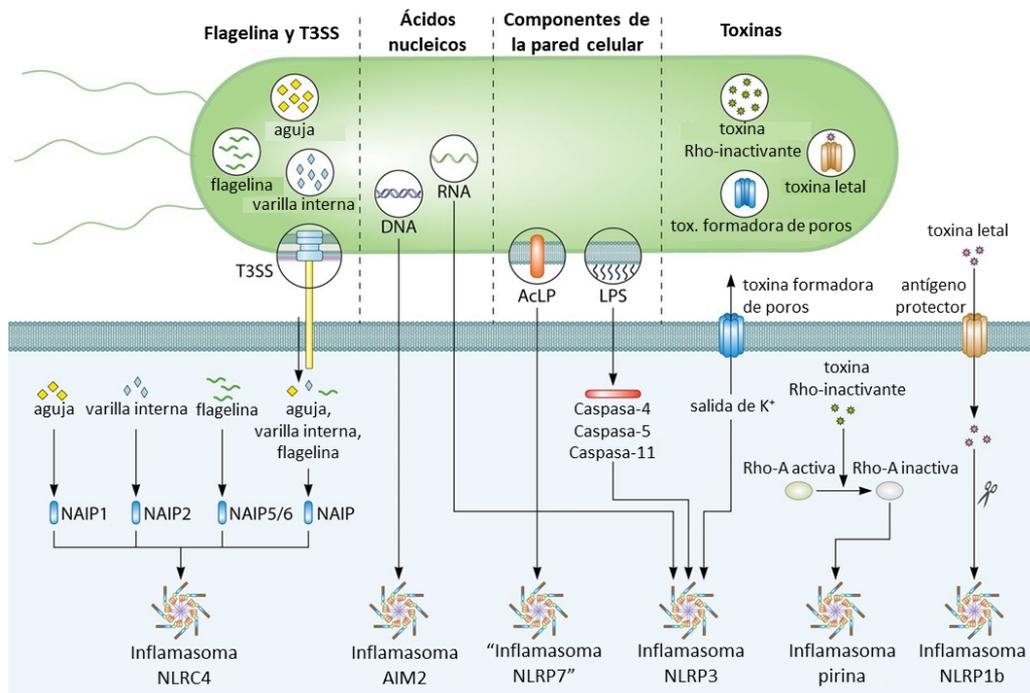
Las citoquinas inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18, que son activadas por la caspasa-1 y liberadas durante la piroptosis, van a tener diversos efectos sobre el sistema inmunitario (**Fig. 35**):

- IL-1 $\beta$  es un pirógeno potente que estimula la fiebre, favorece la migración de leucocitos y estimula la expresión de varias citoquinas y quimioquinas.
- IL-18 induce la producción de IFN- $\gamma$  y es importante para la activación de linfocitos T, macrófagos y otras células.

Ambas citoquinas contribuyen a montar una fuerte respuesta inflamatoria que van a atraer a diversos tipos celulares al sitio de infección para luchar contra el agente infeccioso y resolver la infección (**Fig. 38**).



**Figura 38. Piroptosis en el contexto de infección bacteriana.** El esquema muestra los efectos de la piroptosis en el contexto de una infección bacteriana por una bacteria patógena intracelular (ej. *Salmonella spp.* o *Legionella spp.*) capaz de acceder al huésped y establecer un nicho en el interior de células fagocíticas como los macrófagos. Los distintos componentes bacterianos que van a ser inoculados al citosol van a ser detectados por sensores del inflammasoma y desencadenar el proceso de piroptosis. La lisis celular expone tanto a las bacterias (PAMPs) como a moléculas del interior celular reconocidas como DAMPs por el sistema inmune. Estos junto con las citoquinas inflamatorias liberadas (IL-1 $\beta$  e IL-18) van a montar una respuesta inmune muy potente: estimulan la capacidad de destrucción de los macrófagos y favorecen su presentación por parte de las células dendríticas, que pondrán en marcha la respuesta adaptativa iniciando la activando de linfocitos B y linfocitos T CD4+ y CD8+ en los nódulos linfáticos. *Modificada a partir de la figura en Bedoui et al. (2020).*



**Figura 39. Principales PAMPs bacterianos activadores del inflamasoma.** La figura muestra una compilación de los cuatro grupos principales de componentes bacterianos que desencadenan la activación del inflamasoma (1) componentes del flagelo y de los sistemas de secreción tipo 3 (T3SS), 2) moléculas de ácidos nucleicos bacterianos, 3) componentes de su pared celular, y 4) toxinas), así como sus diferentes sensores en el citoplasma y los inflamasomas que estos forman. *Modificada a partir de la figura en Hayward et al. (2018).*

Como se ilustra en la figura superior, se han descrito un gran número de PAMPs bacterianas capaces de activar la formación del inflamasoma a través de una interacción con una variedad de sensores citoplasmáticos (**Fig. 39**).

Diferentes componentes derivados del flagelo bacteriano activan al inflamasoma vía las proteínas NAIP y NLRP4. También componentes de los sistemas de secreción tipo 3 (T3SS, *type III secretion system*) son reconocidos también por estos sensores. NLRP4 se encuentra muy expresada en enterocitos y en células inmunitarias intestinales, debido posiblemente a su importante papel en la protección frente a las infecciones bacterianas intestinales (**Fig. 39**).

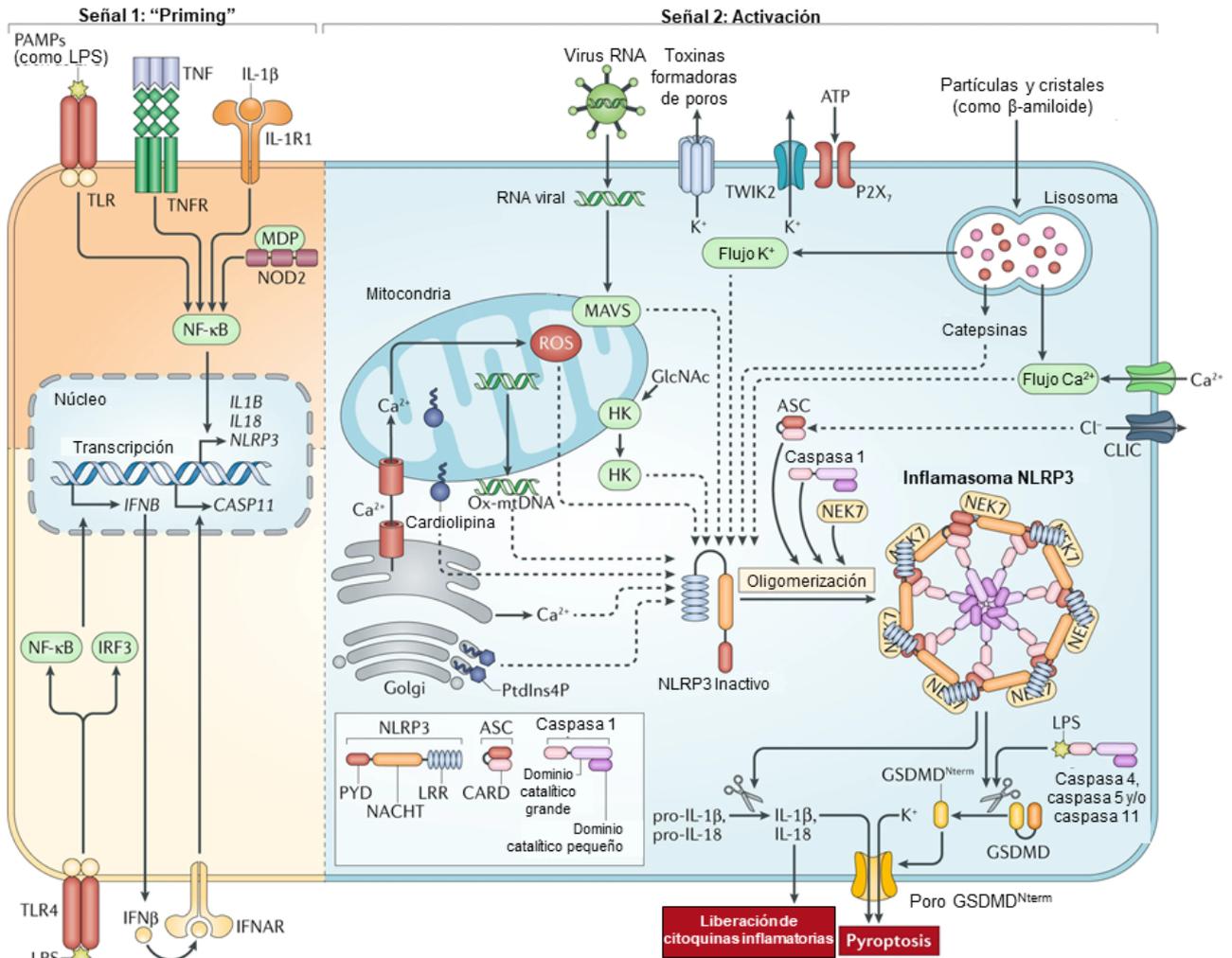
También existen sensores para la detección de DNA y RNA bacterianos. Así, el sensor de DNA AIM2 se activa ante la presencia de DNA, derivado de un amplio rango de bacterias, en el citoplasma. El RNA bacteriano también es 'sentido' por el sensor NLRP3, induciendo también la activación del inflamasoma. Los mRNAs bacterianos, pero no los de las células eucarióticas, activan al inflamasoma NLRP3; curiosamente, si los mRNAs bacterianos son poliadenilados, pierden su capacidad de activar el inflamasoma, lo que sugiere que la poliadenilación va a ser un factor discriminador para que NLRP3 no se active frente al RNA de la propia célula (**Fig. 39**).

El LPS, un componente muy abundante en la membrana de las bacterias Gram-negativas, está compuesta de la parte denominada lípido A, un núcleo oligosacárido y la parte antígeno O, que consiste de repeticiones de glicanos. La caspasa 4 y la caspasa 5 de humanos y la caspasa-11 de ratón reconocen al LPS (**Fig. 39**). La caspasa 11 de ratón, a través de su dominio CARD (del inglés: “*caspase recruitment domain*”), interacciona con la parte lípido A, lo que conduce a su auto-oligomerización y activación, formando un inflamasoma “no canónico”. Así, ratones deficientes en caspasa 11 muestran mayor susceptibilidad a infecciones de bacterias Gram-negativas. Otros componentes de la pared celular como son lipopéptidos acilados activan a NLRP7 de humanos (**Fig. 39**).

Finalmente, varias toxinas bacterianas también son inductoras de la formación del inflamasoma. Las toxinas que producen poros en la membrana de la célula van a causar un eflujo de potasio, lo que activaría al inflamasoma NLRP3. Toxinas con capacidad enzimática se ha visto que inducen a los sensores Pirina o NLRP1 (**Fig. 39**). NLRP1 fue la primera proteína de esta familia en ser descrita. En ratón (NLRP1b), se ha visto que es responsable de la sensibilidad de los macrófagos a la toxina letal (LeTx) de *Bacillus anthracis*; y en humanos, NLRP1 resulta activada por muramil-dipéptido (producto de degradación de la pared celular de bacterias).

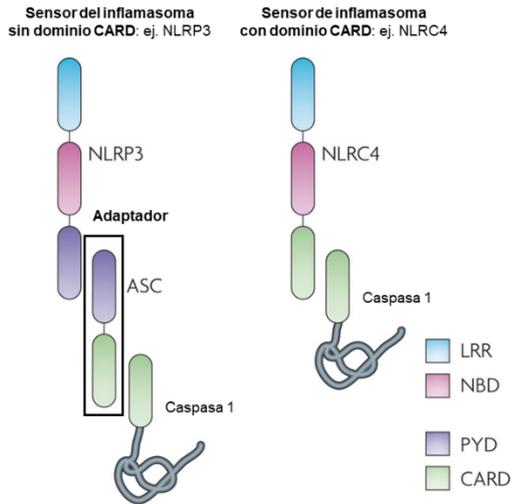
Una de las proteínas NLR más estudiada es NLRP3, que responde a muy diferentes estímulos: tanto a PAMPs como DNA viral, RNA y otras moléculas de patógenos; como a concentraciones elevadas de ATP, irradiación ultravioleta, cristales de ácido úrico, asbestos, sílice y agregados  $\beta$ -amiloides. No es claro cómo una simple molécula puede responder a tal variedad de estímulos, la hipótesis planteada es que NLRP3 debe “sentir” una señal terminal común a todos. Estos estímulos estarían desencadenando múltiples eventos de señalización cuyo denominador común parece ser la generación de estrés celular (**Fig. 40**).

Algunos de estos eventos que han sido postulados como señales unificadoras incluyen la liberación de potasio y el desequilibrio de otros gradientes iónicos (p.ej. entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , salida de  $\text{Cl}^-$ ), la liberación de catepsinas a partir de lisosomas dañados y la producción de especies reactivas de oxígeno, así como otros fenómenos característicos de un elevado estrés mitocondrial (p.ej. relocalización de la cardiolipina, liberación de DNA mitocondrial oxidado). Sin embargo, el mecanismo molecular concreto que estaría mediando la activación del inflamasoma NLRP3 sigue sin estar esclarecido (**Fig. 40**).



**Figura 40. Activación molecular del inflamasoma NLRP3.** Esta figura muestra los diferentes estímulos que se han identificado como activadores del inflamasoma NLRP3. El mecanismo de activación canónico consta de dos señales: 1) "Priming", en el que la presencia de PAMPs o la activación de citoquinas que estimula la transcripción de los componentes de NLRP3. 2) Activación, proporcionada por muy diversos PAMPs y DAMPs que desencadenan múltiples eventos de señalización como el desequilibrio de los gradientes iónicos celulares (eflujo de  $K^+$ , entrada de  $Ca^{2+}$ , salida de  $Cl^-$ ), la disrupción lisosomal o generación de estrés mitocondrial (producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales, relocalización de la cardiolipina, liberación de DNA mitocondrial oxidado). Todavía no está muy claro el mecanismo de activación por parte de los sensores de estos eventos generadores de estrés celular implicados en la activación del inflamasoma NLRP3. *Modificada a partir de la figura en Swanson et al. (2019).*

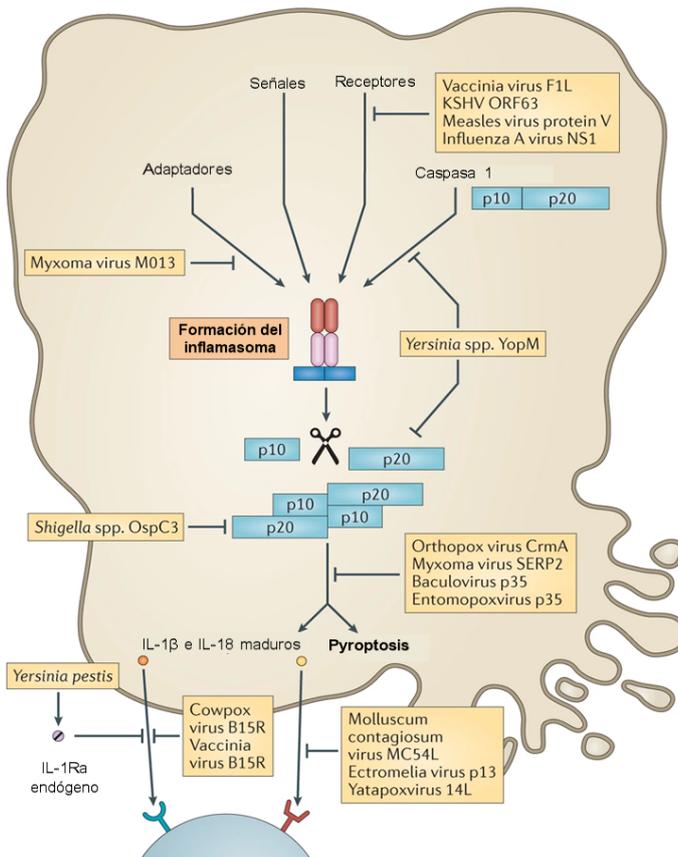
Una vez que se produce el reconocimiento de las señales derivadas de microorganismos (o también del daño producido al propio organismo), estos sensores intracelulares del inflamasoma disparan la formación de un complejo multiproteico denominado inflamasoma, que contiene la caspasa 1. Algunos de ellos poseen dominios CARD y pueden reclutar a la caspasa 1 por sí solos; mientras otros necesitan de una molécula adaptadora como ASC (del inglés: "apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD") que lo posean (Fig. 41).



**Figura 41. Sensor del inflammasoma con o sin dominio CARD.**

Algunos sensores del inflammasoma carecen del dominio CARD (*caspase recruitment domain*), no pudiendo reclutar y activar a caspasa 1 por sí sola. En su lugar presentan un dominio pirina (PYD) que les permite reclutar a la proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) que sí presentan un dominio CARD y permite el reclutamiento de caspasa 1 al inflammasoma. Modificada a partir de la figura en Bergsbaken et al. (2009).

Dado el papel que la piroptosis tiene en el control de las infecciones microbianas, no es sorprendente que los patógenos hayan adquirido diversos mecanismos para limitar la activación de la caspasa 1. Por ejemplo, *Yersinia* va a inducir procesos apoptóticos en macrófagos y células dendríticas, al tiempo que interfiere con la activación de la caspasa 1, impidiendo que las células desarrollen una piroptosis inflamatoria. Su proteína efectora YopM (inyectada en el citoplasma celular por su T3SS) actúa como pseudosustrato de la caspasa 1, bloqueando tanto su actividad enzimática como su reclutamiento al inflammasoma (Fig. 42).

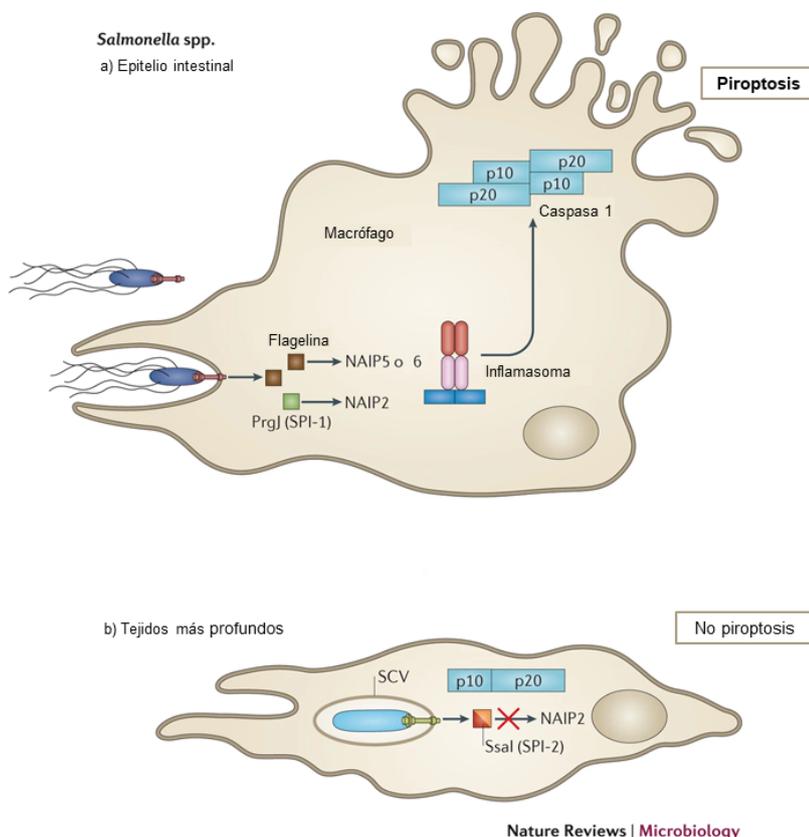


**Figura 42. Inhibición directa por parte del patógeno de interacciones moleculares pro-inflamatorias.**

Diferentes bacterias y virus patógenos (ej. *Yersinia pestis*) han desarrollado una serie de mecanismos para impedir interacciones moleculares esenciales para la activación de la piroptosis y la señalización vía IL- $\beta$  e IL-18. Modificada a partir de la figura en Stewart et al. (2016).

Por otro lado *Salmonella* es capaz de modular la activación de caspasa 1 en distintos puntos de su ciclo a su favor. En las primeras fases de la infección en el tracto gastrointestinal, *Salmonella* induce la formación del inflamasoma vía reconocimiento de componentes de su T3SS y su flagelo. Esto provoca la activación de caspasa 1 y la iniciación de la piroptosis, y la respuesta inflamatoria resultante le ayuda a competir con la microbiota intestinal. Sin embargo, una vez internalizada a *Salmonella* le interesa mantener la viabilidad de la célula en la que reside así como no llamar la atención del sistema inmunitario. En este punto, *Salmonella* deja de expresar el T3SS que estaba expresando y lo sustituye por un segundo T3SS cuya proteína varilla Ssal no es reconocida por el sensor del inflamasoma y no activa a caspasa 1 (**Fig. 43**)

Así, como hemos visto en otros aspectos de la interacción patógeno-hospedador, en este caso también se establece una competición entre el hospedador y el patógeno para regular la activación de la caspasa 1.



**Figura 43. *Salmonella* modula la piroptosis en los distintos estadios de su ciclo.**

a) En las primeras fases de la infección *Salmonella* expresa un sistema de secreción tipo 3 (T3SS) que es reconocido por los sensores del inflamasoma y desencadena el proceso de piroptosis y la respuesta inflamatoria que lo acompaña. b) Una vez internalizada, *Salmonella* expresa otro T3SS diferente cuyos componentes no pueden ser reconocidos por el sensor del inflamasoma. Modificada a partir de la figura en Stewart et al. (2016).

## 8. INMUNIDAD FRENTE A LOS PATÓGENOS A TRAVÉS DE LA LIMITACIÓN NUTRICIONAL.

La limitación de nutrientes por parte del hospedador y la capacidad de adquisición de los mismos por parte de los patógenos son aspectos cruciales en el progreso de la patogénesis de las enfermedades infecciosas. El cuerpo humano supone una reserva magnífica de nutrientes para las bacterias (y otros patógenos) que han evolucionado con la intención de explotar este recurso. Para prevenir la infección por los patógenos, el hombre y muchos otros organismos (animales y plantas) restringen el acceso a nutrientes esenciales, proceso

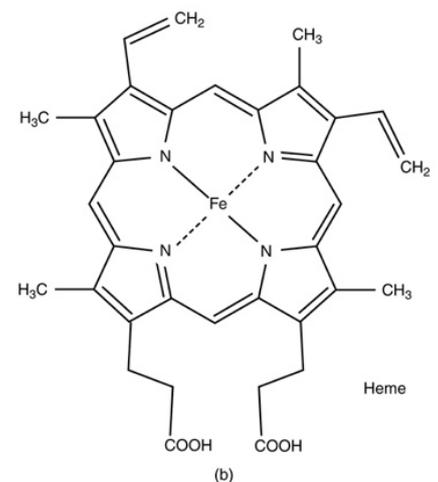
denominado inmunidad nutricional. Aunque, a veces, los hospedadores pueden atacar a los patógenos sometiéndolos a concentraciones tóxicas de estos metales.

La mayoría de los organismos requieren de la primera fila de los metales de transición: manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre y zinc. Con la excepción del zinc, estos metales no tienen completos los orbitales *d*, por lo que son muy activos en reacciones redox. Esta característica es la base de sus propiedades catalíticas, pero también de su toxicidad.

Los metales de transición están implicados en procesos biológicos cruciales y son necesarios para la supervivencia de todos los seres vivos. Estos metales se encuentran formando parte de metaloproteínas, tales como metaloenzimas, proteínas de almacenaje y factores de transcripción. Por otro lado, la actividad catalítica intrínseca de estos metales hace que sean elementos tóxicos si los niveles son altos; por tanto, sus niveles deben estar controlados de una forma bastante estricta.

### 8.1 Hierro (Fe)

El hierro (Fe) es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre y el más abundante metal de transición en el cuerpo humano. Para las bacterias, el Fe es un cofactor de muchas enzimas, implicadas en procesos muy relevantes como la replicación y la transcripción y es clave para el metabolismo. Los grupos protoporfirínicos hemo (**Fig. 44**), conteniendo  $Fe^{2+}$ , forman parte de los citocromos que participan en la generación de energía en la respiración. Dado el gran requerimiento de Fe por las bacterias, los vertebrados tratan de evitar su acceso al Fe como un potente mecanismo de defensa frente a la infección. En cambio, las bacterias han tenido que evolucionar sistemas de adquisición de Fe para poder colonizar los tejidos del hospedador. La relevancia de esta competición por el Fe queda de manifiesto en el hecho de que los pacientes con *talasemias* y

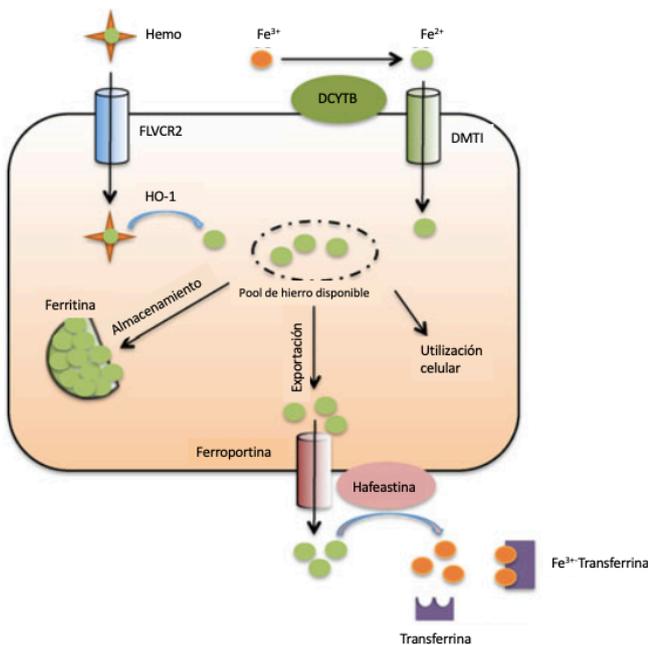


**Figura 44: Estructura del grupo hemo.** Fe central rodeado de cuatro anillos pirrólicos. *Vía Wikipedia Commons*

otras *anemias crónicas*, que requieren transfusiones frecuentes, tienen una mayor incidencia de infecciones, debido a una mayor hemólisis y liberación de hemoglobina. Por otro lado, en áreas endémicas para enfermedades infecciosas como malaria y tuberculosis, se ha constatado que la utilización de suplementos dietéticos con Fe tiene un efecto exacerbante sobre estas enfermedades infecciosas.

Un ejemplo de esto se vio en un estudio en 1978 con refugiados somalís con deficiencias en hierro, donde aquellos que recibieron suplementos de hierro sufrieron 5 veces más infecciones (incluyendo reactivación de malaria preexistente, brucelosis y tuberculosis), respecto a los que recibieron placebo.

Existe una cierta entrada de hierro a partir de la ingesta, produciéndose su absorción en la porción proximal del duodeno. No obstante, la cantidad de hierro que el organismo absorbe es muy poca, de media 1-2 mg/día, por ello es muy importante el reciclaje de los grupos hemo. En el duodeno el Fe se encuentra oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ), esta forma no puede ser utilizada, por lo que es reducido por la acción de una reductasa, DCYTB (del inglés: “duodenal cytochrome B”). Posteriormente entra al enterocito por el transportador DMT1 (del inglés: “divalent metal transporter 1”). Dentro del enterocito hay tres opciones: puede ser utilizado por los enterocitos, puede ser almacenado con moléculas de ferritina (sus subunidades forman un núcleo interior que puede almacenar 4000-5000 átomos de hierro). O puede salir mediante un transportador de hierro denominado ferroportina. Sale reducido, pero inmediatamente es oxidado por una proteína anclada en la membrana basolateral del enterocito, la hafeastina. Esto es necesario para que la transferrina pueda transportarlo. (Fig. 45) Así se transporta por el torrente sanguíneo hasta que la transferrina se ancla a sus receptores (TfR) que se encuentran en cualquiera de las células del organismo.

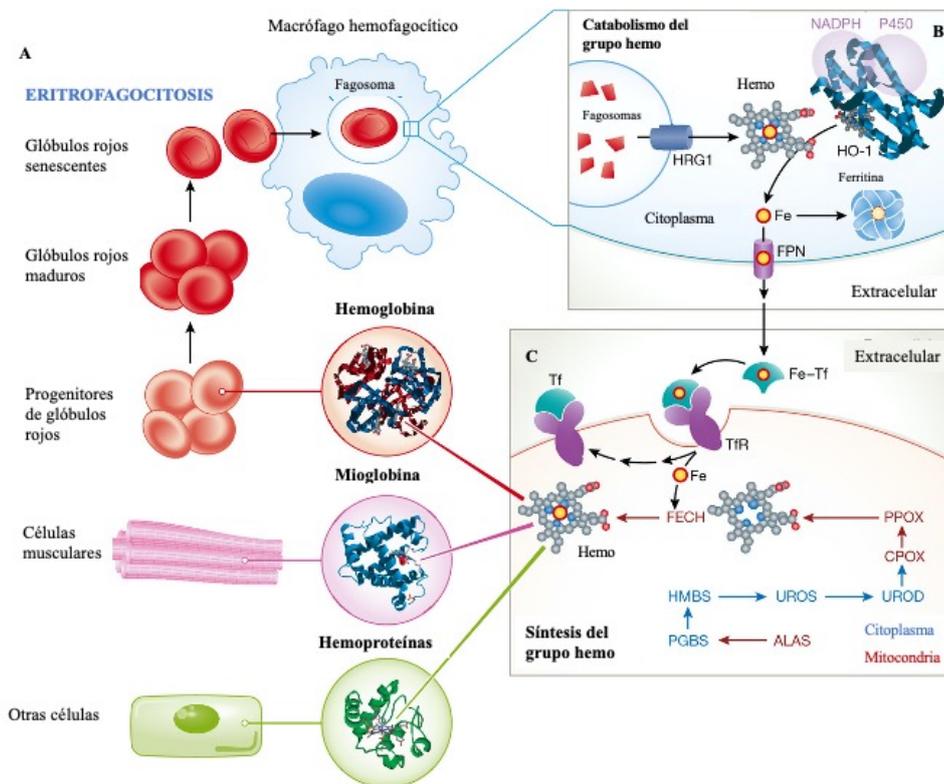


**Figura 45. Transporte de hierro y homeostasis en células humanas.** Previo al transporte a los enterocitos el hierro de la dieta es reducido por una reductasa duodenal, DCYTB. Este es transportado al interior celular por DMT1. A su vez el grupo hemo también puede ser absorbido por el receptor FLVCR2 y se extrae el hierro mediante la HO-1. El hierro podrá ser utilizado para procesos celulares, almacenado con la ferritina o exportado por ferroportina. *Modificada a partir de la figura en Niu et al. (2016).*

La mayoría del hierro que tienen los mamíferos se encuentra en la forma de grupo hemo, el metabolismo de este grupo es un proceso muy controlado, que, entre otras funciones, tiene la de restringir el acceso al hierro de los microbios. Más del 80% de Fe útil en mamíferos existe en forma de hemoproteínas. La mayor parte de los grupos hemo se encuentran formando parte de la hemoglobina de los glóbulos rojos, seguidos por los que forman parte de la mioglobina de las células musculares, y los que componen los citocromos y otras hemoproteínas (Fig. 46a).

El Fe requerido para mantener la síntesis de hemoglobina se obtiene fundamentalmente por macrófagos hemofagocíticos que se encargan de retirar glóbulos rojos envejecidos. En el fagosoma de estos macrófagos la hemoglobina es degradada y el grupo hemo pasa al citoplasma por medio del transportador HRG1 (“*heme-responsive gene-1*”). Allí, la enzima HO-1 (“*hemeoxygenase-1*”) se encarga de extraer el Fe del grupo hemo. Este Fe puede acumularse acompañado a la proteína ferritina o translocado por el transportador ferroportina (FPN) a la transferrina plasmática. (Fig. 46b).

La transferrina se encarga de transportarlo a los tejidos eritropoyéticos donde es utilizado para la síntesis de nuevos grupos hemo. Para la entrada en la célula el complejo Fe-transferrina se une al receptor de transferrina (TfR) y se produce la internalización del grupo Fe (Fig. 46c).



**Figura 46. Interrelaciones entre el metabolismo del hierro y el grupo hemo.** (A) La mayoría del hierro disponible en mamíferos se encuentra en forma de grupo hemo. Se representan las proteínas con grumos hemo, desde las localizaciones con mayor cantidad (los glóbulos rojos) a una menor cantidad en las hemoproteínas. (B) El hierro requerido para mantener la síntesis de hemoglobina se obtiene principalmente mediante la degradación hemofagocítica de glóbulos rojos senescentes. El grupo hemo es transportado por HRG1 al citoplasma donde se extrae el Fe mediante HO-1, este es exportado por la ferroportina (FPN) al espacio extracelular o almacenado unido a la ferritina. (C) En el plasma el Fe se une a la transferrina (Tf) y llegará al compartimento eritropoyético donde se empleará para la síntesis del grupo hemo. *Modificada a partir de la figura en Soares & Weiss (2015).*

### 8.1.1. Limitación de hierro ante infección

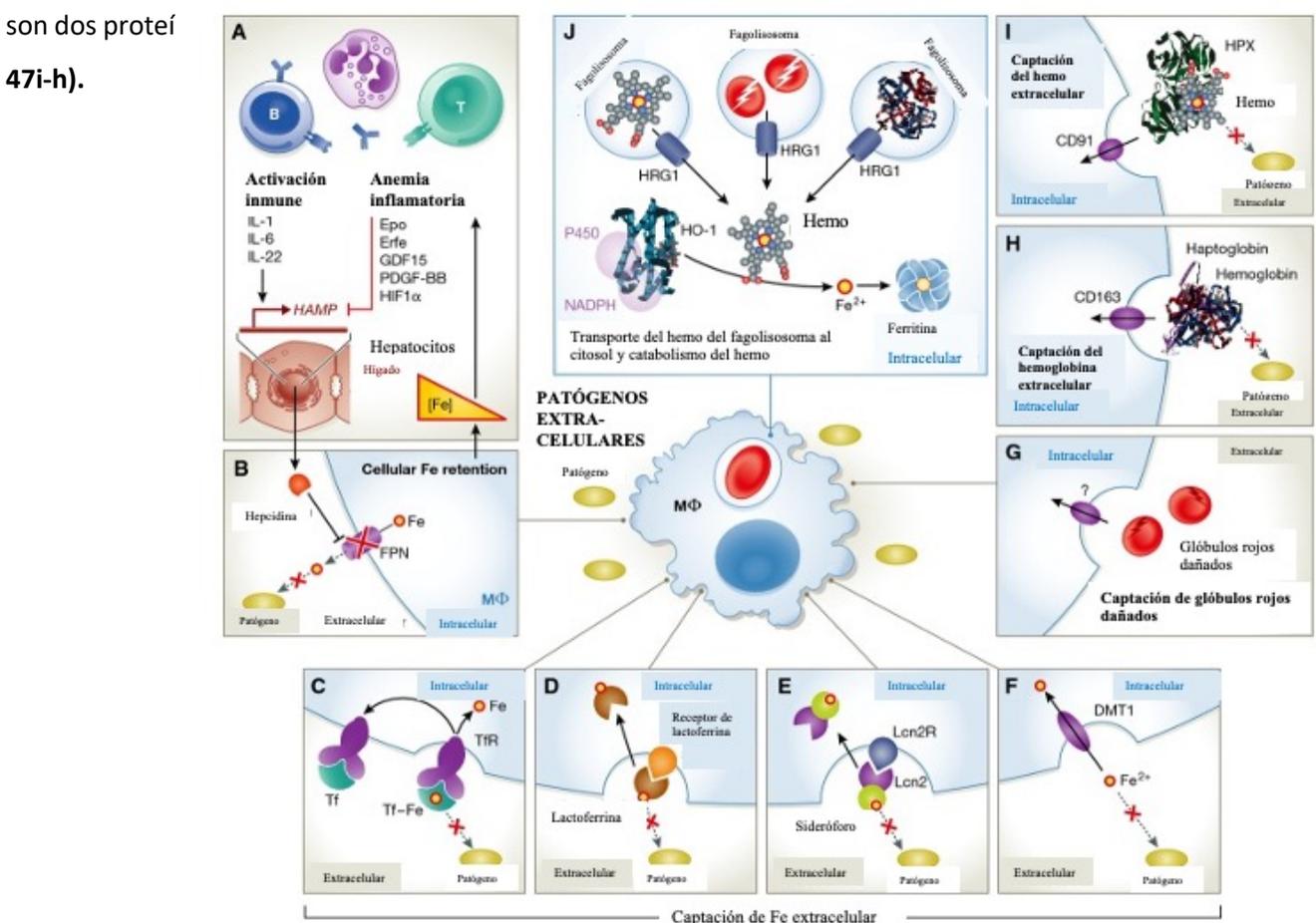
La exportación de Fe por los macrófagos está regulada por la hormona hepcidina, un péptido secretado por los hepatocitos, que se une al transportador FPN y dispara su degradación proteolítica. Esto conduce a una inhibición de la salida de Fe desde los macrófagos (y otras células). Además, la hormona disminuye la absorción

intestinal de Fe, lo que conduce a un estado de hipoferrremia. La producción de hepcidina se aumenta *en respuesta a una hiperferremia* (niveles de Fe circulantes por encima de la normalidad), citoquinas (IL-1, IL-6, IL-22, entre otras) y *presencia de lipopolisacáridos bacterianos*.

En consecuencia, una función de esta hormona es también la de *dificultar* el acceso al hierro de patógenos extracelulares (**Fig. 47a-b**). Así, cuando se produce un proceso infeccioso, el sistema inmunitario innato va a intentar neutralizar el agente infeccioso, induciendo lo que a veces es llamado respuesta de fase aguda (APR, “acute-phase response”). A través de la producción de citoquinas se van a inducir una serie de respuestas sistémicas, entre ellas, la APR altera el metabolismo del hierro en la dirección de minimizar la disponibilidad de este a los patógenos. Así, la APR va a estimular la producción de la hormona hepcidina (a través de la citoquina IL-6), la que va a disminuir los niveles circulantes de hierro.

También los macrófagos, en respuesta a la presencia de patógenos extracelulares, son capaces de inducir la captación de Fe unido a transferrina presente en el suero a través de la expresión de receptores de transferrina (**Fig. 47c**). También cuentan con receptores de lactoferrina, receptores para la proteína Lcn2 (lipocalina2, proteína con afinidad por sideróforos bacterianos, que son moléculas secretadas por muchas bacterias patógenas con la finalidad de unir hierro) y el transportador de metales divalentes DMT1 (**Fig. 47d-f**).

Por otro lado, los macrófagos, además de su función fagocítica sobre glóbulos rojos envejecidos (**Fig. 47g**), disponen de receptores capaces de captar a complejos circulantes de hemoglobina-haptoglobina y de hemo-hemopexina (HPX) a través de los receptores *CD-163* y *CD-91*, respectivamente. La haptoglobina (HP) y la HPX son dos proteí



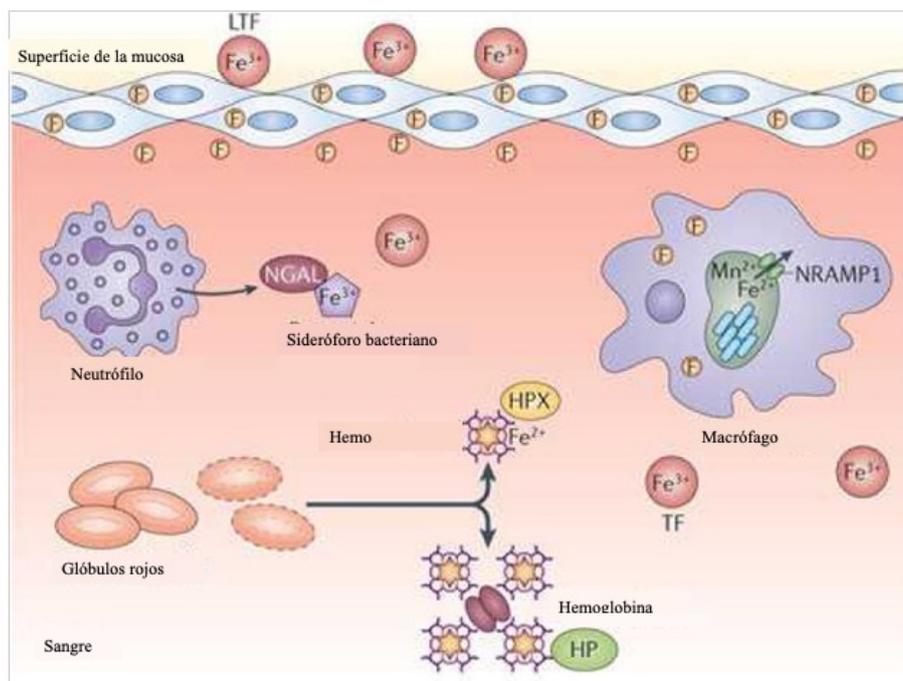
47i-h).

**Figura 47: Regulación del metabolismo del hierro en respuesta a patógenos extracelulares.** Se resumen todas las rutas inducidas por múltiples citoquinas en el progreso de una infección (ver texto para información adicional). *Modificada a partir de la figura en Soares & Weiss (2015).*

Todos estos mecanismos de captación por los macrófagos de los complejos hemoglobina-haptoglobina, hemo-HPX y los eritrocitos dañados se encuentran acoplados a la síntesis de nuevos grupos hemo. Esto se debe a que el transportador HRG1 que se encuentra en la membrana de los fagolisosomas permite la salida del grupo hemo de estos al citoplasma. Allí se procede al catabolismo del grupo hemo gracias a HO-1 (Fig. 47)

Además de encontrarse acompañado con el hemo, el Fe es almacenado intracelularmente (como  $Fe^{3+}$ ) formando complejos con la proteína ferritina. Por otro lado, la proteína NRAMP1 (“natural resistance-associated macrophage protein 1”), localizada en la *membrana fagosomal*, bombea  $Fe^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  fuera del compartimento fagosomal, lo que *reduce* el acceso a estos metales para los patógenos intracelulares que residen en el fagosoma (Fig. 48).

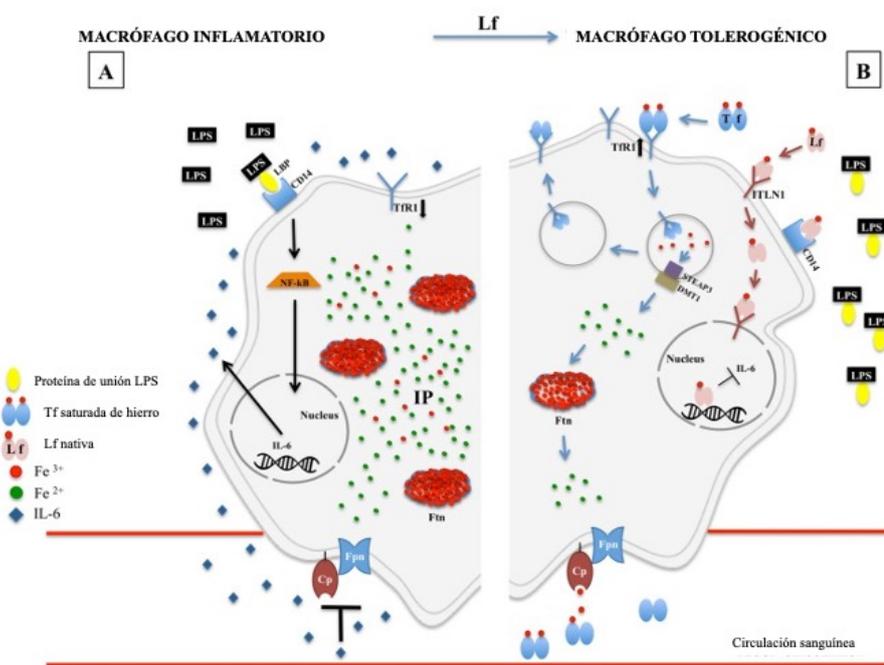
Para combatir la adquisición de  $Fe^{3+}$  mediada por los sideróforos, los vertebrados producen la proteína NGAL (“neutrophil gelatinase-associated lipocalin”), también denominada lipocalina 2 o siderocalina, que une y *secuestra algunos sideróforos* (Fig. 48).



**Figura 48. Limitación de hierro y adquisición de hierro durante las infecciones bacterianas.** Resumen de las estrategias de limitación de Fe en vertebrados. El  $Fe^{3+}$  se almacena intracelularmente mediante un complejo con ferritina (F), unido a la transferrina (TF) en el suero, o unido a lactoferrina (LTF) en la superficie de las mucosas. En la sangre el  $Fe^{2+}$  está acompañado al grupo hemo de la hemoglobina en los glóbulos rojos. Tras la lisis celular la hemoglobina se une a la haptoglobina (HP) y el grupo hemo libre se une a hemopexina (Hpx). Además los neutrófilos producen NGAL que se une y secuestra a los sideróforos bacterianos. *Modificada a partir de la figura en Hood & Skaar (2012).*

A pH fisiológico, el  $\text{Fe}^{2+}$  extracelular se oxida a  $\text{Fe}^{3+}$ , insoluble, que se une con altísima afinidad con la proteína serica transferrina, quien se encarga de movilizarlo de un lugar a otro del organismo (Fig. 48). La mayoría del hierro unido a transferrina es *captado en la médula ósea*, donde los precursores de los eritrocitos incorporan el hierro al grupo hemo durante la síntesis de hemoglobina.

El  $\text{Fe}^{3+}$  también es unido por la lactoferrina, una glicoproteína globular de la familia de las transferrinas que está presente en secreciones como la leche, las lágrimas y la saliva. Cabe indicar que la lactoferrina está también presente en los gránulos de los linfocitos polimorfonucleares y es por tanto un componente crucial de la respuesta innata frente a la infección a nivel de las mucosas. Regula la producción de IL-6 y así el nivel de hierro y la homeostasis celular. En concreto, la lactoferrina inhibe la síntesis de IL-6 que es estimulada por los LPS, permitiendo la salida de hierro y limitando así el acceso a este metal a los patógenos intracelulares (Fig. 49).



**Figura 49. Homeostasis de hierro en macrófagos inflamados por LPS en ausencia (A) o presencia (B) de lactoferrina.** (A) En ausencia de lactoferrina (Lf) la estimulación por LPS al unirse a CD14 induce la traslocación de NF- $\kappa$ B lo que induce una respuesta inflamatoria con producción de IL-6. Esto inhibe la salida de hierro, aumentando la reserva intracelular de hierro. (B) En presencia de lactoferrina, esta es reconocida por ITLN1 e internalizada. El complejo se trasloca al núcleo donde inhibe la síntesis de IL-6. Esto permite la exportación de hierro fuera de la célula, disminuyendo el nivel de hierro intracelular. *Modificada a partir de la figura en Lepanto et al. (2019).*

### 8.1.2. Mecanismos bacterianos de captura de hierro

La concentración óptima de hierro para el crecimiento de la mayoría de bacterias es mayor que la concentración accesible de forma libre en los tejidos del hospedador. Los patógenos, en consecuencia, han evolucionado estrategias, variadas y numerosas, para evadir estos sistemas de inmunidad nutricional. Una estrategia bastante llamativa es la desarrollada por *Borrelia burgdorferi*, el agente causante de la enfermedad de Lyme, que consiste en la sustitución del  $\text{Fe}^{2+}$  por  $\text{Mn}^{2+}$  en muchas de sus enzimas, por lo que no requiere

$\text{Fe}^{2+}$  para infectar a su hospedador. Sin embargo, como se comenta más abajo, el hospedador también posee mecanismos para restringir la disponibilidad de  $\text{Mn}^{2+}$ .

Para la adquisición de Fe, los microorganismos comúnmente utilizan sideróforos y sistemas de adquisición de hemo o de  $\text{Fe}^{2+}$  libre (**Fig. 50**). Los sideróforos, moléculas de bajo peso molecular, son quelantes de Fe que son secretados por las bacterias y que unen  $\text{Fe}^{3+}$  con una *afinidad mayor* que la transferrina y la lactoferrina. Se han descrito cientos de sideróforos distintos. Un ejemplo típico es la yersiniabactina de *Yersinia pestis*, que es capaz de extraer hierro de las proteínas transferrina y lactoferrina, y transferirlo a proteínas específicas de la membrana externa. También existen en algunas bacterias, receptores que son capaces de interactuar directamente con transferrina y lactoferrina, y captar el hierro que transportan. Una vez que han unido Fe, los sideróforos van a ser internalizados en las bacterias a través de un sistema de transporte mediado por el sistema TonB-ExbB-ExbD. En el periplasma, las proteínas SBPs ("*substrate-binding proteins*") reconocen los complejos sideróforo-  $\text{Fe}^{3+}$  y lo transfieren a transportadores de la familia ABC ("*ATP-binding cassette*"), que se encargan de introducirlos al interior celular. Una vez dentro de las bacterias, el  $\text{Fe}^{3+}$  unido a los sideróforos es liberado a través de una reducción a  $\text{Fe}^{2+}$ , que ya puede ser utilizado como nutriente.

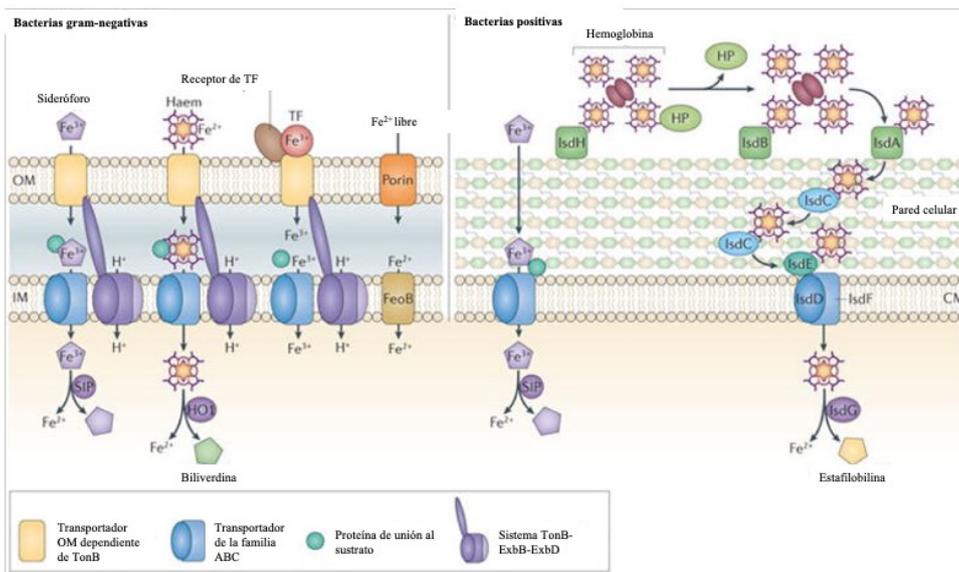
En las bacterias Gram-positivas, la ausencia de una membrana externa hace que los receptores de membrana o el sistema TonB-ExbB-ExbD no sean necesarios.

Los sistemas de adquisición de hemo normalmente constan de un receptor de superficie para el hemo o para hemoproteínas y un transportador que se encargará de introducirlos al citoplasma (**Fig. 50**). Además de estos receptores asociados a la membrana, algunas bacterias secretan proteínas que acomplejan hemo, denominadas hemóforos y que son funcionalmente análogas a los sideróforos. Una vez unidos al hemo, los hemóforos son reconocidos por receptores específicos que se encargan de internalizar el grupo hemo. Una vez translocado al citoplasma bacteriano, el grupo hemo es degradado por enzimas específicas. Así, miembros de la familia HO1, presentes tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, degradan el grupo hemo a  $\text{Fe}^{2+}$  y biliverdina. También en ambos grupos de bacterias, las oxigenasas de la familia IsdG *degradan el hemo* generando  $\text{Fe}^{2+}$  y el cromóforo *estafilobilina* (**Fig. 50**).

Además, algunas bacterias (*Neisseria*, *Haemophilus influenzae*) presentan receptores de transferrina; estos receptores extraen el  $\text{Fe}^{3+}$  de la transferrina y lo introducen en el citoplasma mediante el sistema TonB-ExbB-ExbD (**Fig. 50**). Algunas bacterias también son capaces de transportar  $\text{Fe}^{2+}$  libre a través de las membranas mediante transportadores de la familia FeoB (**Fig. 50**). La proteína FeoB es una proteína grande de membrana que contiene un dominio de unión a GTP y que son similares a las proteínas eucarióticas de unión a nucleótidos de guanina (proteínas G).

La importancia de la inmunidad nutricional como defensa frente a la infección se demuestra como ya hemos comentado en la observación del incremento de susceptibilidad a ciertas infecciones en pacientes con defectos en la homeostasis en los metales de transición. Este hecho recalca el tremendo potencial terapéutico de emplear como diana los sistemas bacterianos de adquisición de metales.

La inmunidad nutricional no es una estrategia defensiva exclusiva de los vertebrados. Mecanismos de restricción de Fe, incluyendo la expresión de ferritinas y transferrinas, existen en plantas y en invertebrados.



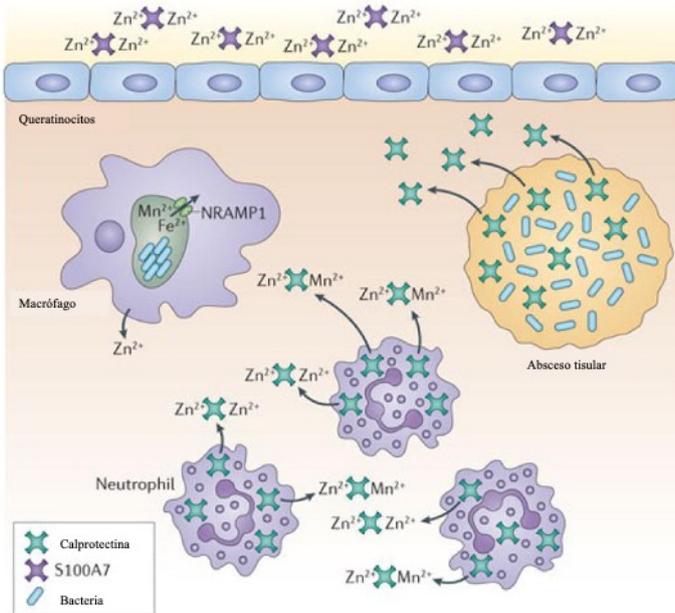
**Figura 50. Adquisición de hierro durante las infecciones bacterianas.** Tanto las bacterias Gram-negativas como Gram-positivas poseen sistemas para adquirir Fe<sup>3+</sup> a través de los sideróforos, Fe<sup>2+</sup> del grupo hemo, Fe<sup>3+</sup> de la transferrina y/o directamente Fe<sup>2+</sup> libre. *Modificada de la figura en Hood & Skaar (2012).*

## 8.2 Manganeso y Zinc

La inmunidad nutricional no está sólo limitada a estrategias destinadas a retirar Fe. El Mn<sup>2+</sup> y el Zn<sup>2+</sup> también son elementos vitales para las bacterias. Así, el Mn<sup>2+</sup> tiene una función catalítica en muchas proteínas y es importante en la resistencia frente al estrés oxidativo. Por ejemplo, muchos patógenos presentan superóxido dismutasas dependientes de Mn<sup>2+</sup> como defensa frente al ión superóxido. El Zn<sup>2+</sup> es el segundo metal de transición más abundante en los seres vivos, donde desempeñan tanto funciones catalíticas como estructurales en las proteínas. Por tanto, dada la importancia de estos elementos en la fisiología de las bacterias y otros patógenos, no es sorprendente que el secuestro de estos elementos sea también una estrategia de defensa innata.

La familia S100 es una extensa familia de proteínas de unión a Ca<sup>2+</sup> presentes en vertebrados, algunas de las cuales actúan en la defensa frente a las infecciones (**Fig. 50**). Así, la S100A7 (también conocida como psoriasina) es secretado por *los keratinocitos* e inhibe el crecimiento microbiano mediante la quelación de Zn<sup>2+</sup>.

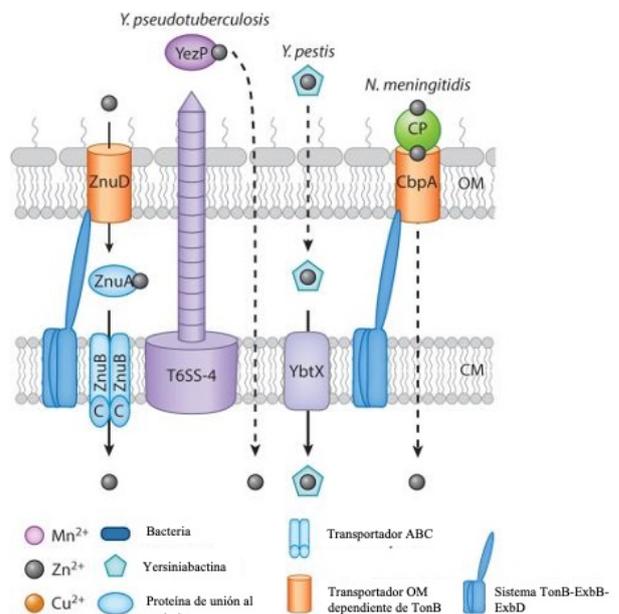
S100A8 (también conocida como calgranulina A o MRP8) y S100A9 (también conocida como calgranulina B o MRP14) funcionan como un heterodímero denominado calprotectina. Esta proteína supone aproximadamente del 40-50% de la composición proteica del citoplasma de los *neutrófilos* y tiene un efecto antimicrobiano frente a un amplio rango de patógenos bacterianos y hongos. La actividad microbicida se debe a su capacidad de quelar  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  con muy alta afinidad (en el rango nanomolar) (Fig. 51).



**Figura 51. Homeostasis de  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  ante la infección.** Las proteínas de la familia S100 van a secuestrar ambos iones tanto en la superficie epitelial como dentro de los abscesos tisulares producidos por las bacterias. *Modificada de la figura en Hood & Skaar (2012).*

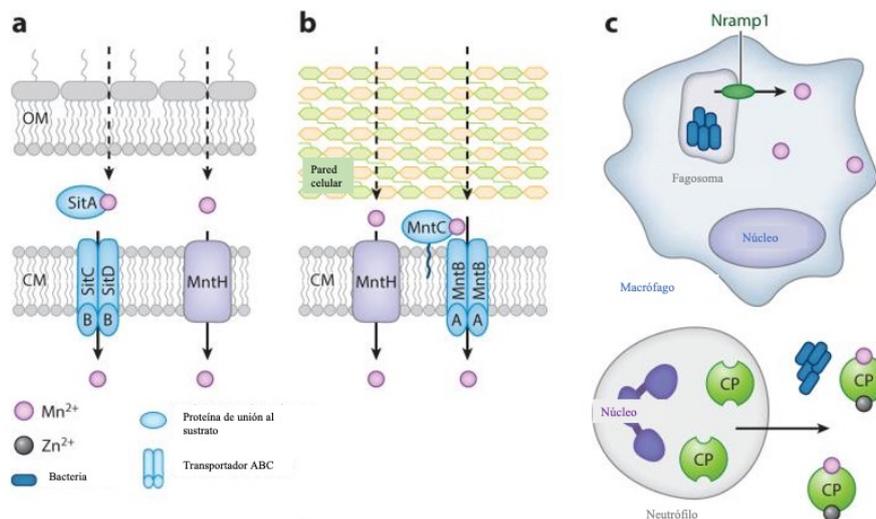
Las bacterias patógenas adquieren zinc mediante transportadores ABC tales como ZnuABC (en bacterias Gram-negativas) y AdcABC (en Gram-positivas). Otros sistemas de adquisición son la proteína YezP de *Yersinia pseudotuberculosis*, un ‘zincóforo’ con gran afinidad por zinc, y la yersiniabactina-Zn<sup>2+</sup> en *Yersinia pestis*. Por su parte, *Neisseria meningitidis* cuenta en su membrana externa con el receptor CbpA que une calprotectina (Fig. 52).

**Figura 52. Mecanismos de secuestro e importe de Zinc por las bacterias.** *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* y *N. meningitidis* han desarrollado mecanismos particulares de importe de Zinc. Desde sistemas con mucha afinidad por Zn, zincóforos, transportadores específicos de complejos yersiniabactina-Zn o moléculas con mucha afinidad por la calprotectina que secuestra el Zn. *Modificada de la figura en Palmer & Skaar (2016).*



Muchos patógenos bacterianos cuentan con transportadores de la familia ABC para importar  $Mn^{2+}$ . Los patógenos Gram-negativos importan  $Mn^{2+}$  mediante transportadores SitABCD o MntH. Cabe destacar que se desconoce el mecanismo por el que traspasa la membrana externa. En el caso de los patógenos Gram-positivos el  $Mn^{2+}$  se importa con los transportadores MntABC o MntH (**Fig. 53a-b**).

Por ello, el hospedador limita la disponibilidad de este elemento en el fagosoma, donde han sido internalizadas bacterias, mediante la bomba de eflujo Nramp1, o de forma extracelular mediante la secreción de calprotectina, que también secuestra  $Mn^{2+}$ . (**Fig. 53c**). La relevancia de la exclusión de  $Mn^{2+}$  (y también de hierro) del fagosoma por NRAMP1 queda patente en la existencia de polimorfismos en su gen codificante (denominado SLCA11) que están asociados a una mayor susceptibilidad a la tuberculosis, a las enfermedades por meningococos y a la lepra.



**Figura 53. Restricción intra y extracelular de Manganeso y mecanismos bacterianos. (A)** Sistema de captación de  $Mn^{2+}$  por los patógenos Gram-negativos. **(B)** Sistema de captación de  $Mn^{2+}$  por lo patógenos Gram-positivos. **(C)** Sistemas celulares para limitar la disponibilidad de  $Mn^{2+}$  en respuesta a la infección. *Modificada de la figura en Palmer & Skaar (2016).*

### 8.3 Cobre

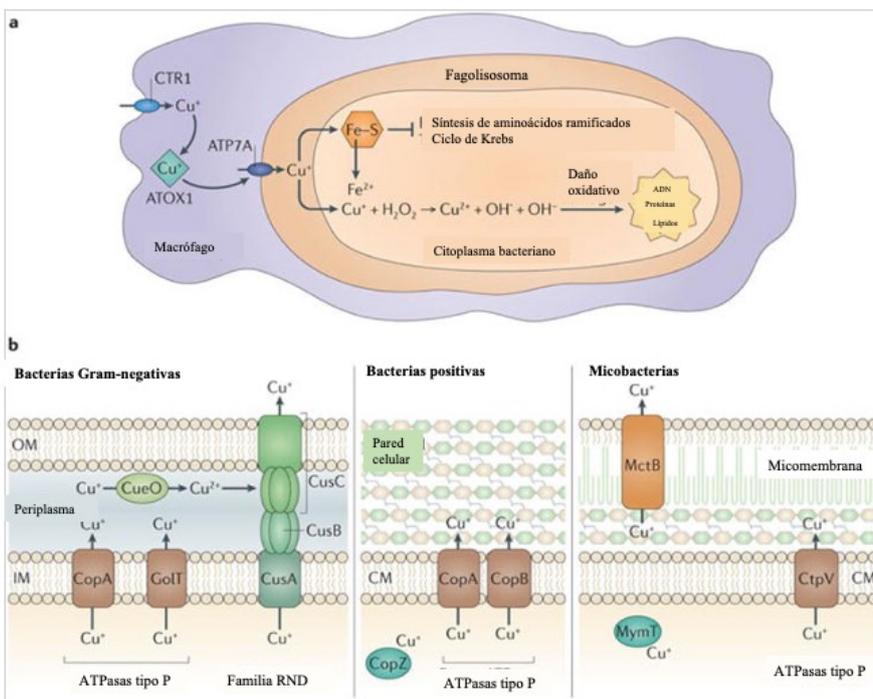
Desde hace milenios se conocen los efectos antibacterianos del cobre, habiéndose usado con finalidades industriales para evitar el crecimiento de bacterias y habiéndose utilizado en muchos instrumentos médicos para reducir el riesgo de infecciones bacterianas. Por ejemplo, las vasijas hechas de cobre para el almacenamiento de agua y comida se utilizaban en los tiempos de los persas, y se continuaron utilizando en la época de fenicios, griegos, romanos y egipcios. De hecho, en un escrito egipcio datado en el 1500 antes de Cristo se documenta el uso de sales de cobre con fines curativos. Más recientemente, durante los dos últimos siglos, el uso de sales de Cu, Ag y otros metales estaba muy extendido. De hecho, fue prevalente hasta el

descubrimiento de los antibióticos. Sin embargo, ahora, como consecuencia de la expansión de microorganismos resistentes a los antibióticos, su uso se está volviendo a reconsiderar.

El mecanismo por el que el  $\text{Cu}^+$  resulta tóxico no es totalmente conocido, pero podría ser multifactorial, implicando tanto el daño oxidativo por el desplazamiento del Fe en los grupos Fe-S presentes en varias proteínas. Al igual que el Fe,  $\text{Cu}^+$  puede experimentar la química Fenton, reaccionando con el peróxido de hidrógeno para producir radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), que van a producir daños en los lípidos, las proteínas y el DNA (Fig. 54a).

Su papel en la defensa antimicrobiana ha sido demostrado en las infecciones pulmonares de *M. tuberculosis*, observándose una acumulación de cobre en los sitios de infección. En los mamíferos, el  $\text{Cu}^+$  se acumula en los fagolisosomas de los macrófagos. El IFN- $\gamma$  (producido por linfocitos T estimulados en respuesta a la infección) induce la expresión de CTR1 (*Cu<sup>+</sup> transport protein 1*), que de forma activa adquiere  $\text{Cu}^+$  del medio extracelular al interior del macrófago. ATOX1 se encarga de entregar el  $\text{Cu}^+$  a ATP7A, un transportador de  $\text{Cu}^+$  situado en la membrana fagolisosomal, y que se encarga de acumular  $\text{Cu}^+$  dentro de este compartimento (Fig. 54a).

Muchas bacterias patógenas cuentan con sistemas de exportación para evitar la acumulación del  $\text{Cu}^+$  en su citoplasma. Tanto Gram-positivas como Gram-negativas emplean ATPasas de tipo P. A demás las Gram-negativas emplean proteínas de la familia RND. También las micobacterias poseen la proteína metalotionina MymT que secuestra el cobre en el citoplasma (Fig. 54b).



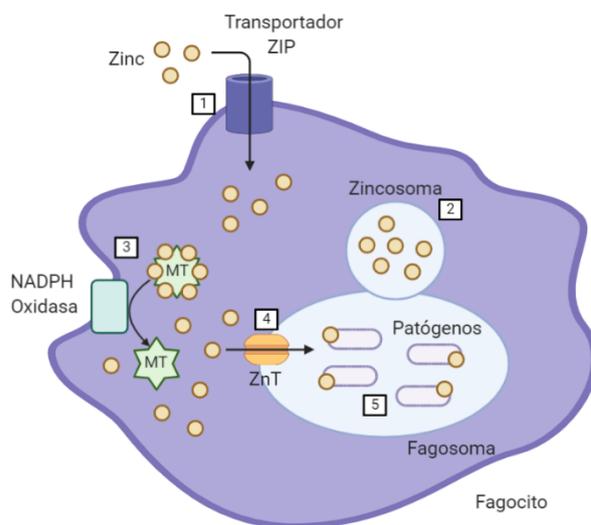
**Figura 54. Nuevas perspectivas sobre los efectos del cobre sobre la inmunidad innata.**

(A) Mecanismos de intoxicación por cobre dentro de los macrófagos. La acumulación de cobre en el interior de los fagolisosomas contribuye a la eliminación de las bacterias por múltiples mecanismos, (B) Las bacterias tienen diversos mecanismos para detoxificar sus citoplasmas o periplasmas en situación de exceso de cobre. *Modificada de la figura en Hood & Skaar (2012).*

Por otro lado, se ha visto que la intoxicación por Zinc ( $Zn^{2+}$ ) es un mecanismo de defensa que se utiliza por el hospedador. Así, como respuesta a la infección, células del sistema inmunitario innato como los fagocitos acumulan  $Zn^{2+}$  en el citoplasma. El  $Zn^{2+}$  se transporta al fagocito probablemente por un transportador de la familia ZIP. Luego en el citoplasma puede:

- Ser secuestrado por Metalotioneínas (MT), que posteriormente será liberado por oxidación facilitada gracias a la NADPH oxidasa del fagocito. Luego el  $Zn^{2+}$  se libera en el fagosoma por un transportador de la familia ZnT.
- Formar un Zincosoma que, posteriormente, se fusiona al fagosoma.

Es en este compartimento es donde el  $Zn^{2+}$  intoxica a la bacteria, ya que un exceso de  $Zn^{2+}$  puede inhibir enzimas glicolíticas o la cadena de transporte electrónico (**Fig. 55**).



**Figura 55. Estrategia empleada por los fagocitos para inhibir la supervivencia de bacterias intracelulares por intoxicación con Zinc.**

1. Entrada del Zinc por un transportador ZIP al interior del fagocito. 2. Formación del Zincosoma que, posteriormente, puede fusionarse al fagosoma. 3. El Zinc es secuestrado por Metalotioneínas (MT) que luego es liberado por oxidación (facilitada por la NADPH oxidasa del fagocito). 4. Entrada del Zinc al fagosoma por un transportador de la familia ZnT. Creado con Biorender a partir de figura en Sheldon & Skaar (2019).

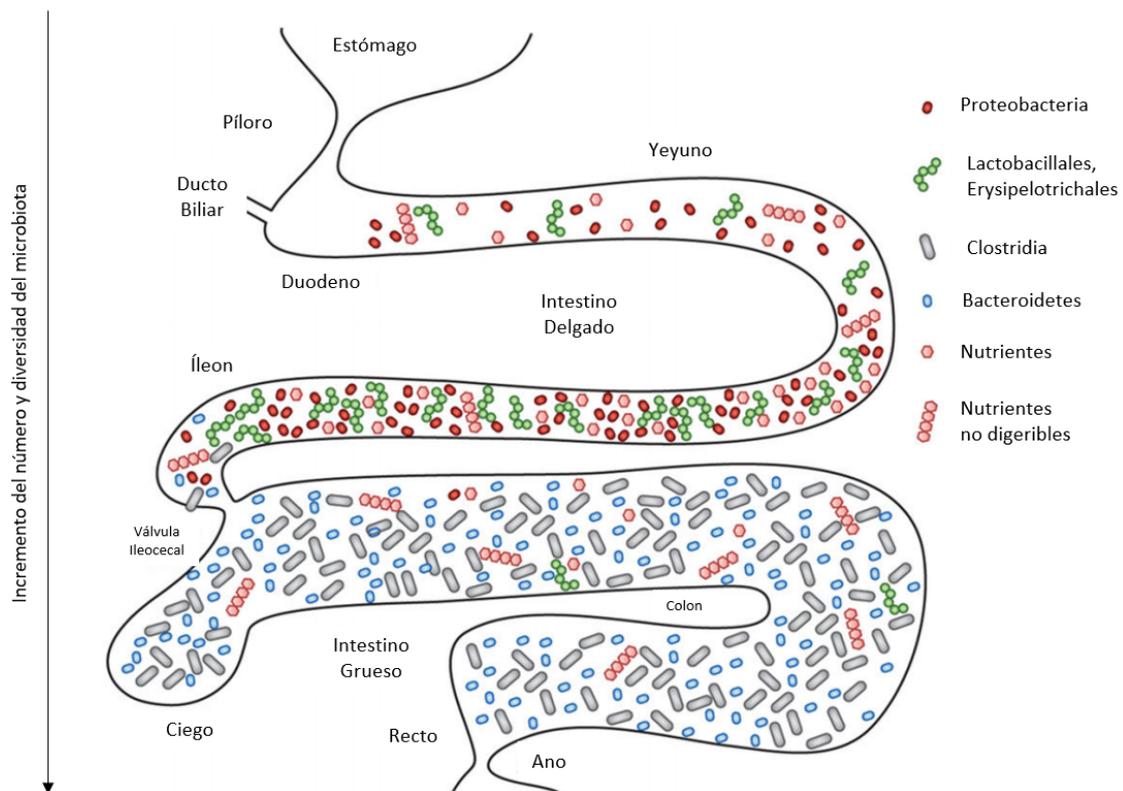
(\*) MT = Metalotioneínas

## 9. RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA INMUNITARIO Y LA FLORA INTESTINAL

El tracto intestinal de los mamíferos contiene una comunidad diversa constituida por billones de microorganismos que han coevolucionado con el sistema inmunitario durante millones de años. Muchos de estos microorganismos realizan funciones críticas para la fisiología del hospedador, pero este debe permanecer vigilante para que esta relación simbiótica se mantenga. Con este objetivo, mantener la homeostasis, el sistema inmunitario desempeña un papel clave en el mantenimiento de la diversidad microbiana, en los sitios anatómicos permitidos, al tiempo que está vigilante frente a invasiones de microbios patógenos. Existe una interacción recíproca entre el **sistema inmunitario** y el **microbiota intestinal**, en

cuanto a que esta es fundamental para el adecuado desarrollo del sistema y las respuestas inmunitarias, por su lado, van a regular la estructura y composición de la flora intestinal.

El intestino humano aloja unos 100 billones de microbios, pertenecientes mayoritariamente a unas 500 especies de bacterias. La composición bacteriana varía a lo largo del tracto intestinal, y cada especie bacteriana coloniza un determinado nicho (**Fig. 56**).



**Figura 56. Distribución espacial y composición microbiana a lo largo del tracto intestinal.** El intestino delgado es rico en nutrientes, utilizados tanto por los microbios como por el hospedador para crecer. Proteobacteria (mayoritariamente enterobacteria), Lactobacillales y Erysipelotrichales (especialmente Turicibacter) son dominantes en el intestino delgado. Por el contrario, el intestino grueso es pobre en nutrientes y, por lo tanto, presenta menos número de estas bacterias, mientras que los Bacteroidetes y Clostridia pueden utilizar fibras indigestibles como fuentes de energía que son abundantes en esta región. *Modificada a partir de figura en Kamada et al. (2013).*

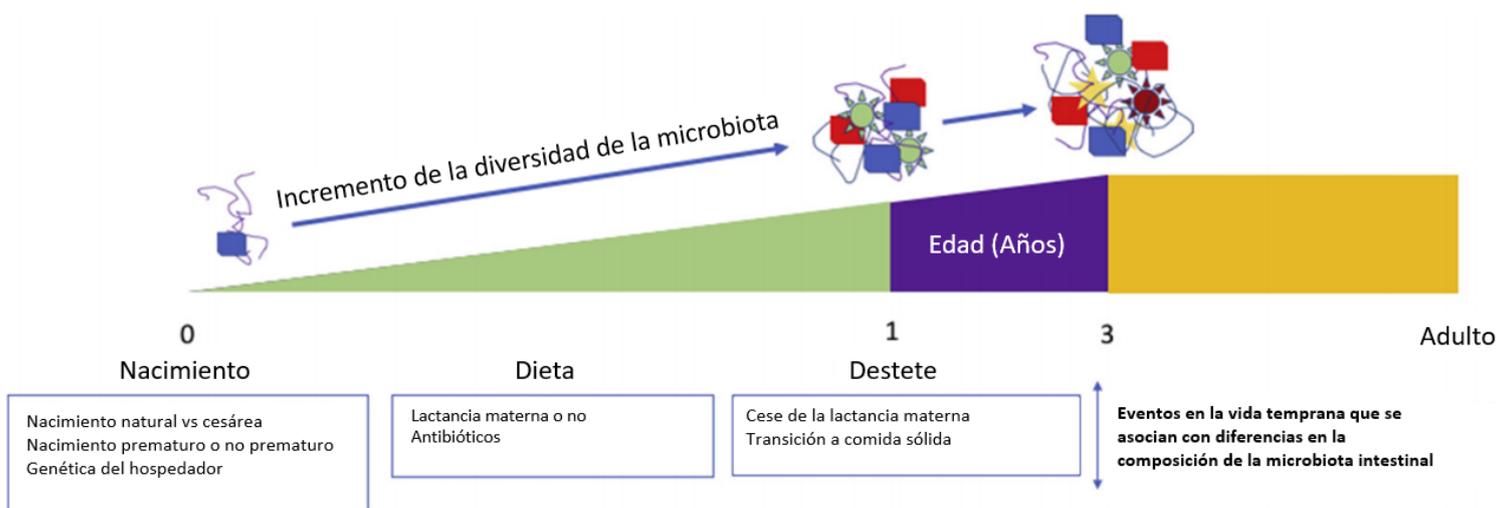
En individuos sanos, los principales filos de eubacterias presentes en el intestino son:

- **Gramnegativas:** Las proteobacterias y Bacteroidetes.
- **Grampositivas:** Los Firmicutes.
- Las **arqueobacterias** más abundantes son las metanogénicas.

Además de su adaptación al ambiente intestinal, entre estos microorganismos comensales se han establecido redes ecológicas para la adquisición de nutrientes. En este sentido, un factor crítico que define la distribución y composición del microbiota es el requerimiento de nutrientes de los microorganismos comensales.

La colonización se inicia en el momento del nacimiento, siendo los primeros microbios de origen materno, que posteriormente se van modificando en función de características genéticas del hospedador y ambientales. En cuanto a las características ambientales, encontramos diferentes eventos que se asocian con diferencias en la composición del microbiota intestinal (**Fig. 57**):

- Nacimiento: Si ha sido de forma natural o por cesárea o si ha sido prematuro o no.
- En cuanto a la dieta, antes del primer año de vida: Los factores principales son la lactancia, si es materna o no y la utilización de antibióticos.
- En el primer año de vida el destete es un evento importante, la transición a la comida sólida.
- A los tres años la composición del microbiota intestinal se estabiliza.



**Figura 57.** Evolución del microbiota desde el nacimiento hasta la edad adulta. La diversidad microbiana aumenta desde el nacimiento hasta los tres años de vida y se estabiliza. La genética, modo de nacimiento, dieta y factores ambientales se asocian a diferencias en la composición microbiana intestinal. *Modificada a partir de la figura en Gensollen & Blumberg (2017).*

El intestino supone un ambiente rico en nutrientes para el microbiota. A cambio, el microbiota genera vitaminas y otros nutrientes básicos para el hospedador, al tiempo que contribuye a generar una resistencia frente a la colonización por potenciales patógenos.

Esta resistencia a la colonización puede darse por mecanismos directos e indirectos (**Fig. 58**).

En cuanto a los mecanismos indirectos, las bacterias comensales median la producción de péptidos antimicrobianos como RegIIIy (*Regenerating islet-derived protein IIIy*) o Angiogenina-4 (ANG4).

El microbiota es capaz de potenciar la expresión de RegIIIy estimulando TLR (*Toll-like receptors*). Por un lado, el LPS estimula a TLR-4 que resulta en la producción de RegIIIy por parte de las células de Paneth. La flagelina estimula a TLR-5 de células dendríticas CD103c+ y R484 (*TLR-7 agonist resiquimod*) estimula a TLR-7 de células

dendríticas CD11c+. Las células dendríticas activadas liberan IL-23 que estimula a las células linfoides innatas (ILC3) y comienzan a producir IL-22 promoviendo que las células de Paneth produzcan RegIII $\gamma$ .

Por otro lado, la taurina (metabolito microbiano) señala mediante un complejo del inflamosoma a la célula epitelial intestinal. Esta señalización potencia la producción de citoquinas proinflamatorias incluyendo IL-18 que potencia la producción de péptidos antimicrobianos, incluyendo ANG4 (**Fig. 58a**).

Otro mecanismo indirecto incluye el metabolismo de ácidos biliares. Algunas bacterias comensales como *Clostridium scindens* pueden deshidroxilar un ácido biliar primario dando un ácido biliar secundario mediante la 7 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Este ácido biliar secundario es capaz de inhibir el crecimiento de *C. difficile* (**Fig. 58b**).

Además, el microbiota también mantiene la barrera epitelial induciendo la producción de mucus, y la activación transcripcional del factor nuclear NF- $\kappa$ B en las células epiteliales, que retrasa la apoptosis y repara el tejido. Los patógenos se restringen a sitios donde hay daño epitelial por la expresión de la quimioquina CXCL1 que recluta neutrófilos y la expresión de IL-12 que activa ILC1s para liberar IFN $\gamma$  y reclutar a los fagocitos (**Fig. 58c**).

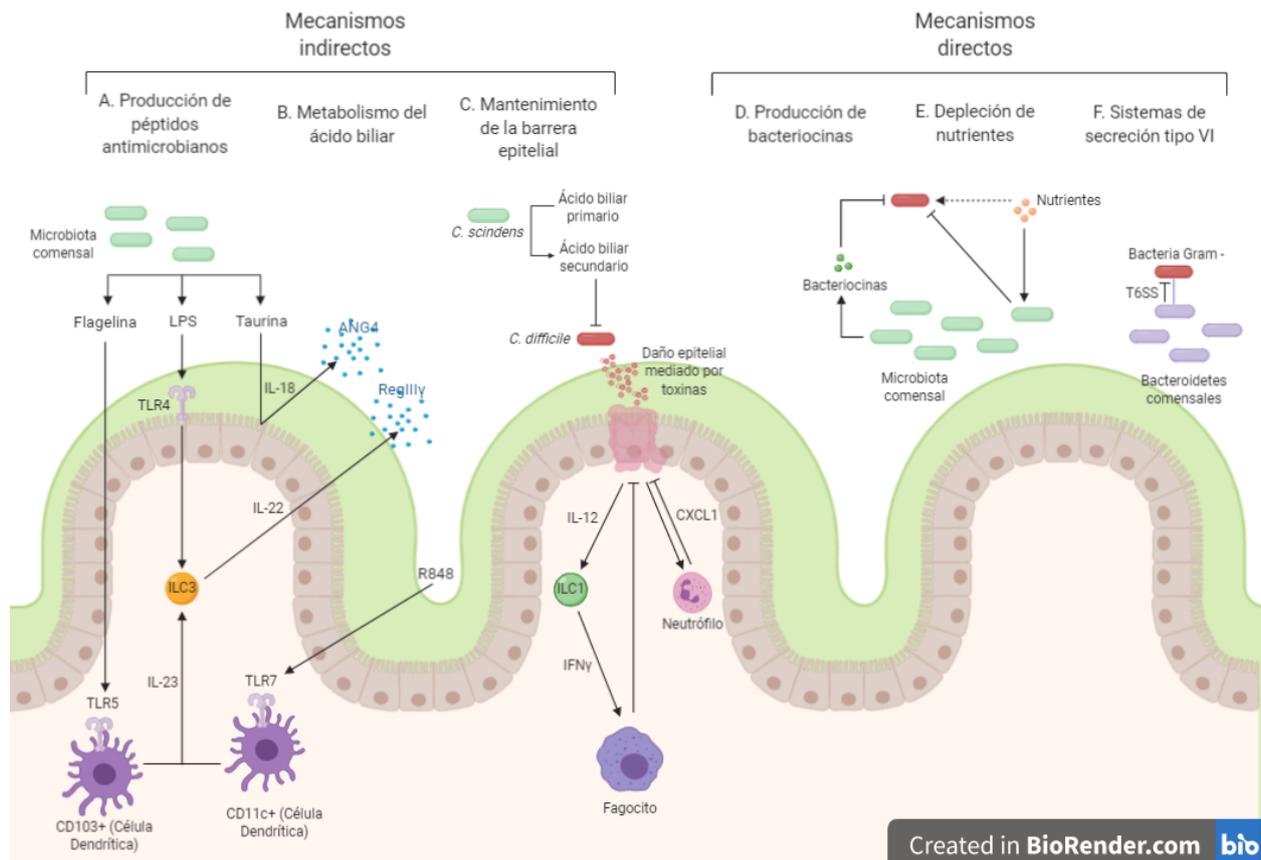
Los mecanismos directos incluyen la producción de bacteriocinas, que inhiben a patógenos específicos con un impacto mínimo en el microbiota intestinal (**Fig. 58d**). Por ejemplo, *E. coli* produce una bacteriocina que inhibe el crecimiento de un patógeno relacionado *E. coli* enterohemorrágica.

Además, el microbiota compite con los patógenos por los nutrientes y metabolitos microbianos, lo que promueve una reducción de la colonización por patógenos (**Fig. 58e**). Por ejemplo, *E. coli* comensal compite con la variante hemorrágica por ácidos orgánicos, aminoácidos y otros nutrientes.

Por último, hay bacterias gram negativas en el microbiota, como los Bacteroidetes que pueden llevar toxinas a patógenos de una forma dependiente de contacto vía el Sistema de secreción tipo VI (**Fig. 58f**).

Además, las bacterias comensales también impiden la infección por patógenos al alterar las condiciones ambientales (por ejemplo, el pH). Así, algunas bacterias generan ácidos grasos de cadena corta, que alteran el pH local e inhiben el crecimiento de ciertos patógenos intestinales. Por ejemplo, especies de *Bifidobacterium*, bloquean la colonización por parte de *E. coli* patogénica; de forma similar, un pH óptimo es necesario para el crecimiento de *Bacillus cereus* para la secreción de enterotoxinas.

Por otro lado, las bacterias comensales, a través de la producción de metabolitos específicos, pueden también afectar a la virulencia del patógeno. Así el butirato, ácido graso de cadena corta, disminuye la expresión de varios genes de virulencia entre los que se incluyen los codificantes del sistema de secreción tipo III en varios serotipos de *Salmonella enterica*.

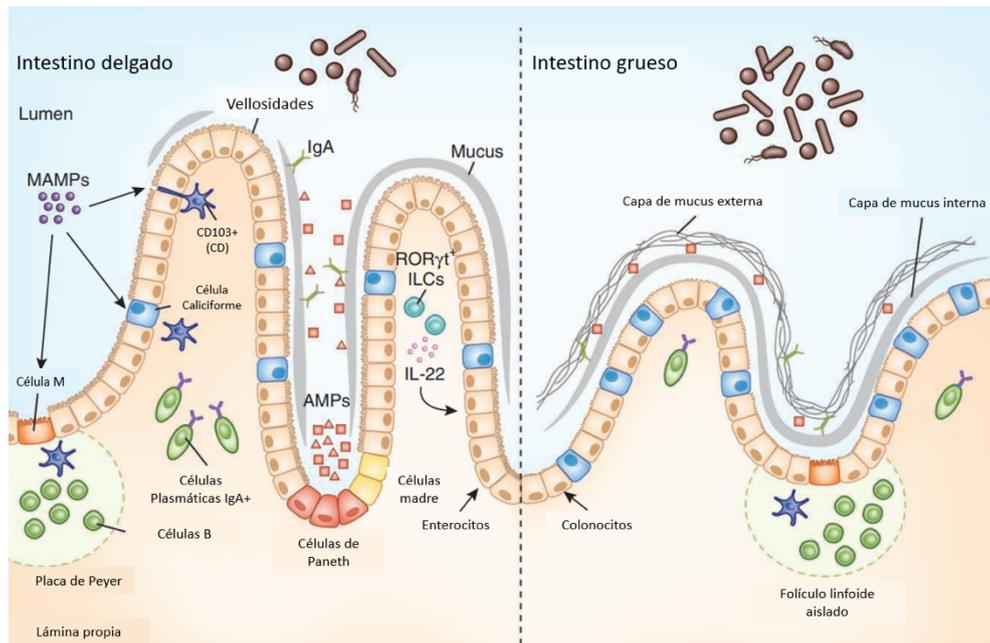


**Figura 58. Mecanismos directos e indirectos que contribuyen a la resistencia a la colonización por patógenos.** Creado con BioRender a partir de figura en Kim et al (2017).

Por su parte, los **patógenos entéricos** utilizan sus estrategias para esquivar la competencia con los microorganismos comensales. Una de estas estrategias es la de promover una respuesta inflamatoria en el hospedador, la que a su vez va a comprometer la supervivencia de las bacterias comensales. Al disminuir la competencia con las bacterias comensales, el patógeno encuentra menos dificultades para multiplicarse.

El sistema inmunitario asociado al intestino debe mostrarse tolerante frente al microbiota, pero a la vez debe estar vigilante frente a potenciales amenazas ejercidas por algunos de los microorganismos. Con esta finalidad, resulta muy importante que el microbiota intestinal se mantenga a una distancia prudencial de las células epiteliales intestinales (CEIs), para minimizar la probabilidad de que se produzcan daños en el tejido y la subsiguiente invasión.

Las estrategias inmunitarias innatas incluyen una barrera de mucus, péptidos antimicrobianos (AMPs, “antimicrobial peptides”) y células linfoides. Existen variaciones en las estrategias empleadas a nivel del intestino grueso o delgado, aunque la finalidad en ambos lugares es la misma: promover el mutualismo y mantener el microbiota en determinados sitios anatómicos (**Fig. 59**).



**Figura 59. Confinamiento anatómico del microbiota a lo largo del intestino.** El epitelio intestinal se compone de una única capa de enterocitos o colonocitos, y el sistema inmunitario cumple el papel de proteger la integridad de esta barrera. En el intestino delgado, la capa de mucus es discontinua y con pocas células caliciformes. En esta zona hay gran cantidad de células de Paneth en las criptas que secretan AMPs, estas pueden unirse a la capa de mucus. A través de esta barrera, las células M y las células caliciformes pueden reconocer antígenos a través de MAMPs y presentárselos a células dendríticas (CDs). Las ILCs ROR $\gamma$ t pueden reconocer señales microbianas y producir IL-22 colaborando así en la función de barrera de las células epiteliales intestinales. IgAs específicas frente a las bacterias comensales son producidas por las células plasmáticas en la lámina propia, proceso activado por las células dendríticas mediante un mecanismo dependiente de células T. El intestino grueso contiene una capa de mucus más gruesa y continua para compartimentar el microbiota, en la que la IgA y los AMPs tienen un papel secundario. *Modificada a partir de figura en Brown et al. (2013).*

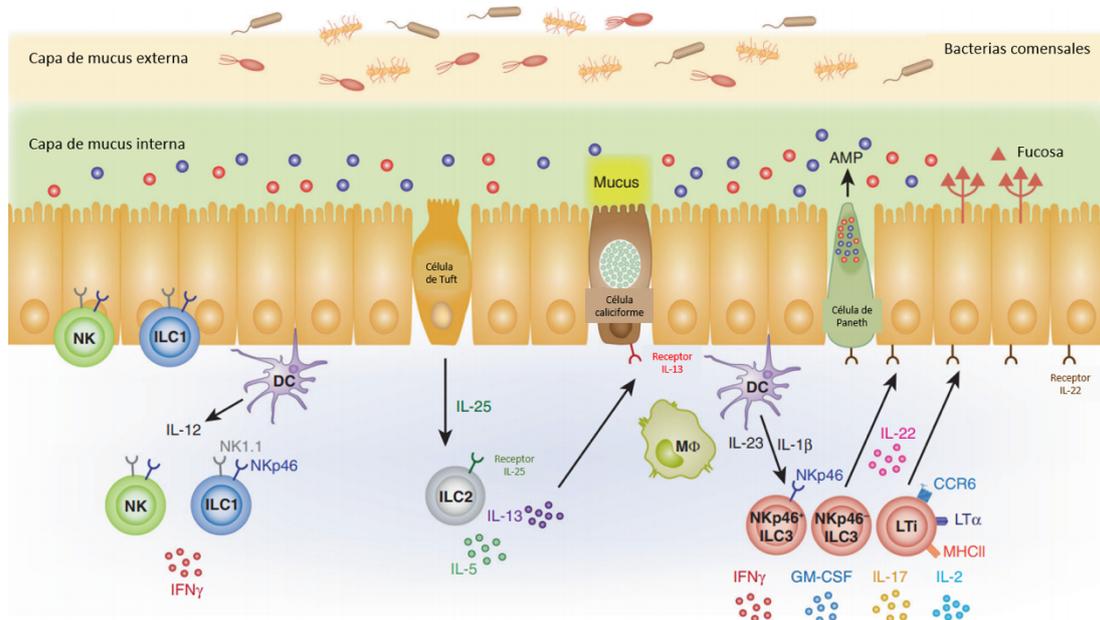
En el intestino grueso, donde el microbiota intestinal puede alcanzar números de  $10^{12}$  células por gramo de heces, la capa de mucus es un componente vital del sistema inmunitario innato para separar el microbiota del epitelio intestinal. Células epiteliales especializadas, llamadas células caliciformes (“*Goblet cells*”), secretan glicoproteínas (mucinas) que se ensamblan en una capa gruesa de mucus que se extiende unas 150 micras desde el epitelio. La cara externa de esta capa de mucus desempeña un papel relevante en la selección del microbiota asociado a la mucosa al actuar como fuente de nutrientes; la densidad en la cara interna de la capa va a ser importante para evitar el contacto directo de las bacterias con el epitelio.

En cambio, la capa de mucus en el intestino delgado carece de caras interna y externa distinguibles, y resulta secretada de forma discontinua a lo largo de la superficie apical. En este tejido, arsenales de AMPs son fundamentales para segregar al microbiota del epitelio. Estos incluyen las defensinas y las lectinas tipo C, que son producidas principalmente por las células de Paneth, una línea celular propia del intestino delgado y que se localizan cerca de las células madre (*stem cells*) epiteliales en la cripta.

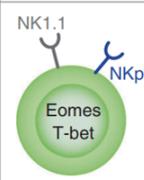
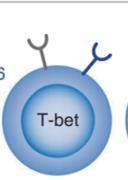
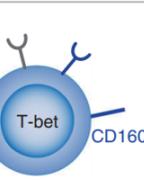
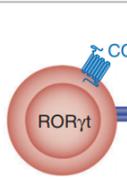
Las células de Paneth son esenciales para contener al microbiota, y una pérdida de estas células conduce a una invasión aumentada de la barrera epitelial por microbios tanto patogénicos como simbióticos. Los AMPs secretados son retenidos en la capa de mucus, formando una barrera para proteger a los IECs del contacto microbiano. Muchos de estos péptidos matan directamente a los microbios al alterar la pared celular, sin discriminar si son patógenos o comensales.

Las células linfoides innatas (ILCs, *innate lymphoid cells*) son una población de células del sistema inmunitario innato que responden rápidamente a las citoquinas derivadas de las células epiteliales y que son críticas para el mantenimiento de la homeostasis del intestino (**Fig. 60**). Aunque no son CD4+, estas células presentan patrones de expresión de citoquinas similares a las subseries de linfocitos T ayudadores (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 and T<sub>H</sub>22), pero contrario a los linfocitos T, la diferenciación de las ILCs ocurre independientemente de la recombinación somática. El desarrollo y la función de las ILCs depende de la expresión específica de factores de transcripción: T-bet (ILCs del grupo 1), GATA-3 (ILCs del grupo 2) o RORγt (ILCs del grupo 3) y contienen sus propios marcadores de superficie y citoquinas estimuladoras y efectoras (**Fig. 61**).

Al igual que ocurre con muchos componentes del sistema inmunitario, las ILCs establecen una relación bidireccional con el microbiota: las respuestas de las ILCs cambian dependiendo de la composición microbiana, y la función efectora de las ILCs tiene un efecto sobre la composición y la contención anatómica del microbiota (**Fig. 60**).



**Figura 60. El papel de ILCs en el tejido epitelial en el estado estacionario (homeostasis).** Se ilustran subconjuntos de ILCs y, para simplificar, nos centramos en el papel de las citoquinas en la activación de las mismas. Las células NK y ILC1s se encuentran principalmente en el epitelio. La expresión del receptor de IL-25 en la superficie de las ILC2s las permite responder a IL-25 que se produce por las células de Tuft, entonces ILC2 se activa y produce IL-5 e IL-13, que promueve la producción de mucus por parte de las células caliciformes. Luego, las ILC3s responden a IL-23 e IL-1β que producen las células mieloides. La producción de citoquinas en el estado estacionario por ILC, especialmente IL-22, indica a las células de Paneth y a las células epiteliales que induzcan la producción del péptido antimicrobiano (AMP) y otras respuestas, como la fucosilación de glicoproteínas y glicolípidos, los cuales contribuyen a la composición del microbioma. *Modificada de la figura en Seo et al. (2020).*

	NK	ILC1	ieILC1	nILC2	iILC2	LTi (CCR6 <sup>+</sup> ILC3)	NKp46 <sup>+</sup> -ILC3 (CCR6 <sup>-</sup> ILC3)
Marcadores de superficie y factores de transcripción							
Citoquinas estimuladoras	IL-12 IL-15 IL-18	IL-12 IL-15 IL-18	IL-12 IL-15	IL-25 TSLP IL-18 IL-33	IL-25 TSLP IL-18	IL-23 IL-1β	IL-23 IL-1β
Citoquinas efectoras	IFN $\gamma$ Perforina Granzima	IFN $\gamma$	IFN $\gamma$	IL-4 IL-5 IL-13 IL-9 AREG	IL-4 IL-5 IL-13 IL-17	IL-17 IL-22 GM-CSF LT IL-2	IL-17 IL-22 GM-CSF IFN $\gamma$ IL-2

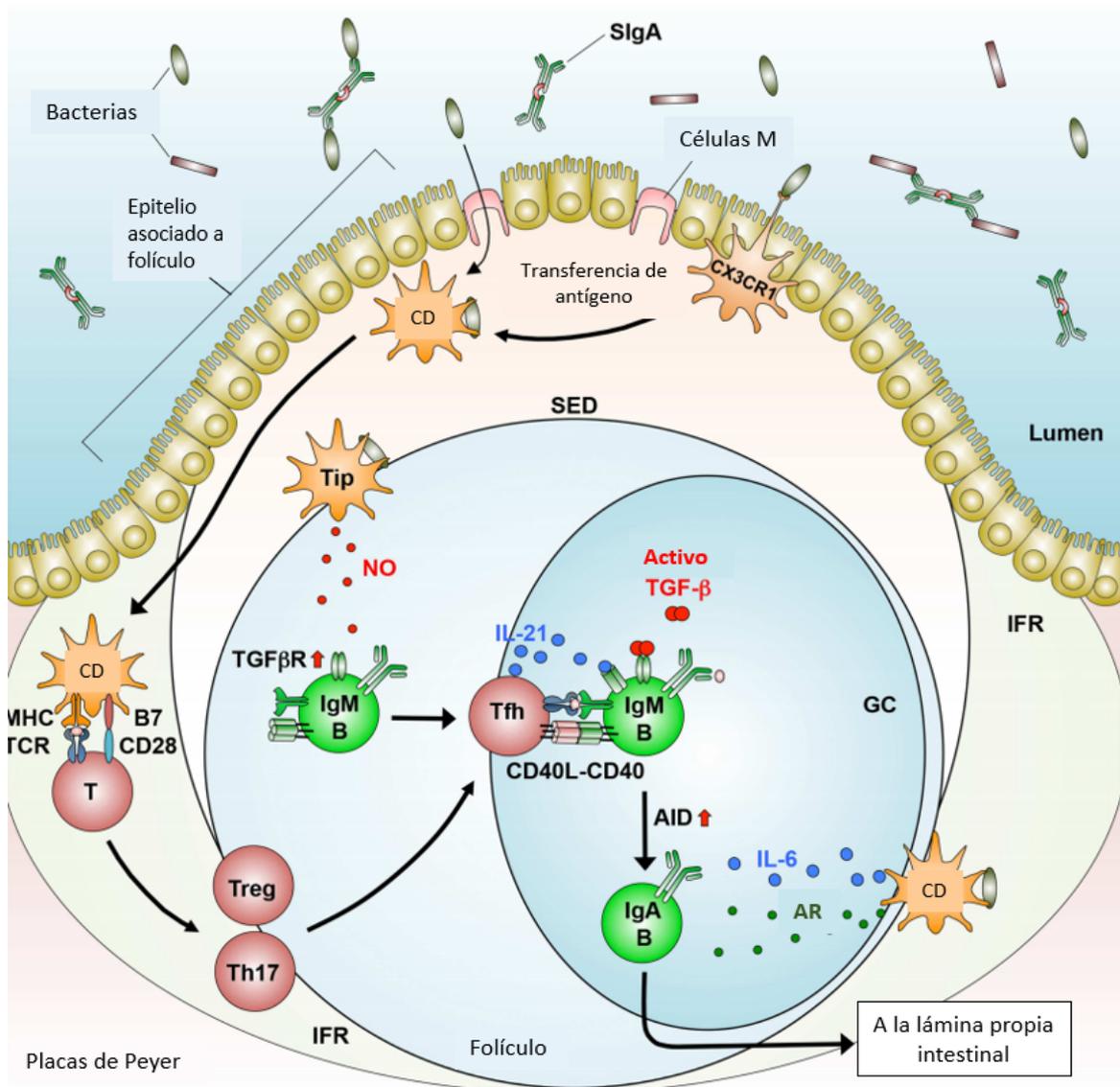
**Figura 61. Subconjuntos de ILCs y funciones durante la infección.** Podemos ver los marcadores de superficie y factores de transcripción, además de las citoquinas estimuladoras y efectoras de cada subconjunto. *Modificada de la figura en Seo et al. (2020).*

El sistema inmunitario intestinal en mamíferos libres de gérmenes apenas se desarrolla y es deficiente en muchos componentes, incluyendo anticuerpos circulantes y linfocitos T mucosales, y tampoco produce mucus y AMPs. Esto indica que la presencia del microbiota intestinal induce la maduración inmunológica.

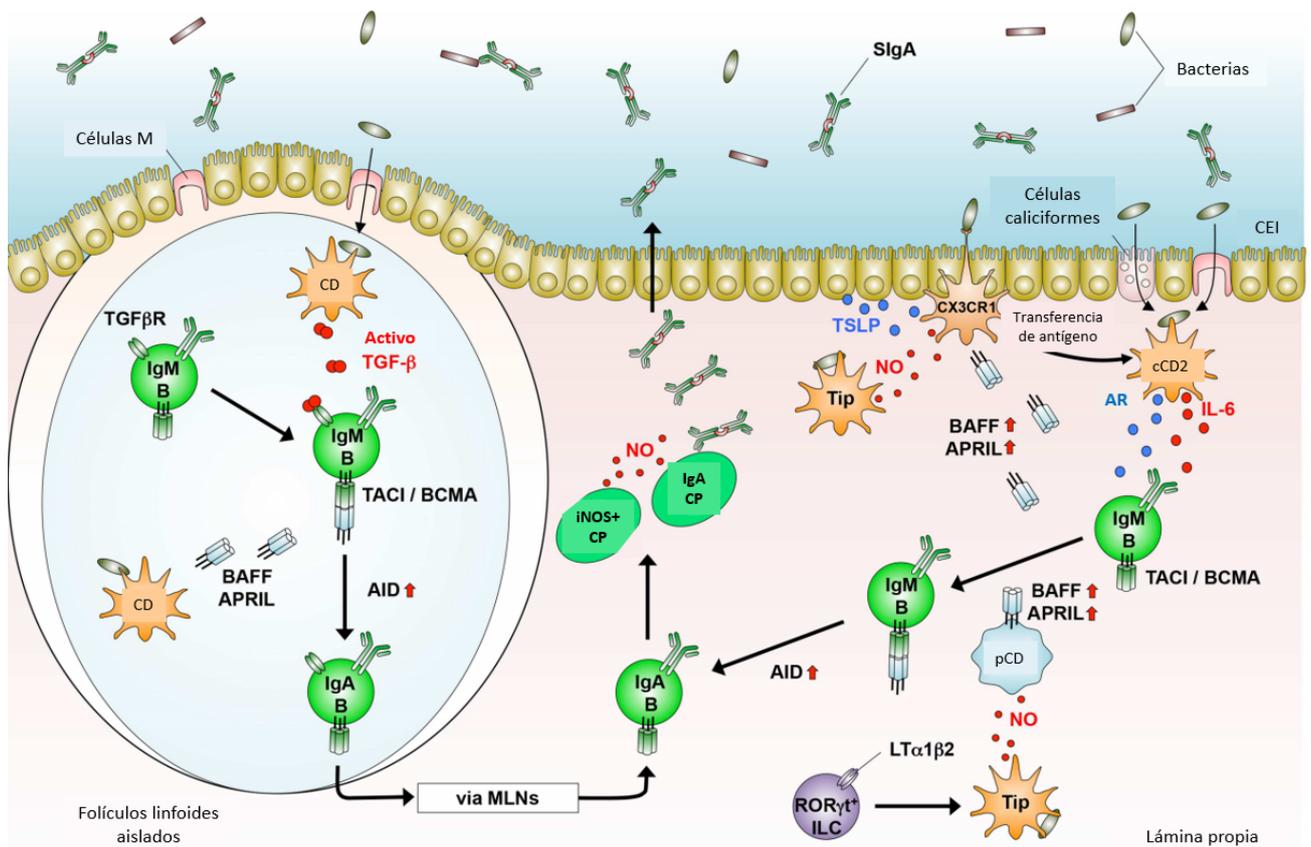
Por otro lado, el sistema inmunitario debe ser capaz de “sentir” qué microbios están presentes y responder en consecuencia. Las IECs y células hematopoyéticas expresan una serie de proteínas llamadas PRRs (*pattern recognition receptors*), que van a mediar la interacción entre el sistema inmunitario y el microbiota. Entre las PRRs se encuentran las TLRs (*Toll-like receptors*) y las NLRs (*nuclear oligomerization domain-like receptors*) que reconocen moléculas de los patógenos, denominadas MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*), entre las que se encuentran el lipopolisacárido (LPS), el lípido A, el peptidoglicano, la flagela y ácidos nucleicos microbianos (RNA y DNA). Las interacciones PRR-MAMP activan una variedad de vías de señalización, promoviendo importantes funciones como la producción de mucinas, AMPs e IgA. Estudios en modelos animales han mostrado que la falta de algunas PRRs conduce a alteraciones en la barrera intestinal que conducen a una invasión microbiana de órganos internos. El reconocimiento de MAMPs es particularmente importante en el intestino delgado, donde no existe una gruesa capa de mucus que aleje al microbiota de la pared intestinal.

Mientras que el sistema inmunitario innato da protección mediante la capa de mucus, AMPs e ILCs para controlar de forma indiscriminada la composición del microbiota y su penetración del epitelio, el sistema inmunitario adaptativo, a través de la producción de IgA, supone un nivel adicional de protección. La producción de IgA ocurre tras la estimulación de linfocitos B presentes en los parches de Peyer (*Peyer’s*

patches) por células dendríticas, que son las encargadas de capturar y procesar algunas bacterias que consiguen atravesar la capa de mucus. Un ambiente de citoquinas adecuado, en particular la presencia de TGF- $\beta$ , promueve el cambio de clase en los linfocitos B que comienzan a producir IgA, inmunoglobulina que es transportada al lumen intestinal mediante transcitosi (Fig. 62 y Fig. 63). La IgA va a recubrir a las bacterias, impidiendo su interacción con el epitelio intestinal. Así, personas deficientes en IgA experimentan con mayor frecuencia alteraciones intestinales ocasionadas por respuestas inmunitarias inflamatorias. El repertorio de IgA secretadas es dinámico y se ajusta a los cambios en la composición del microbiota.

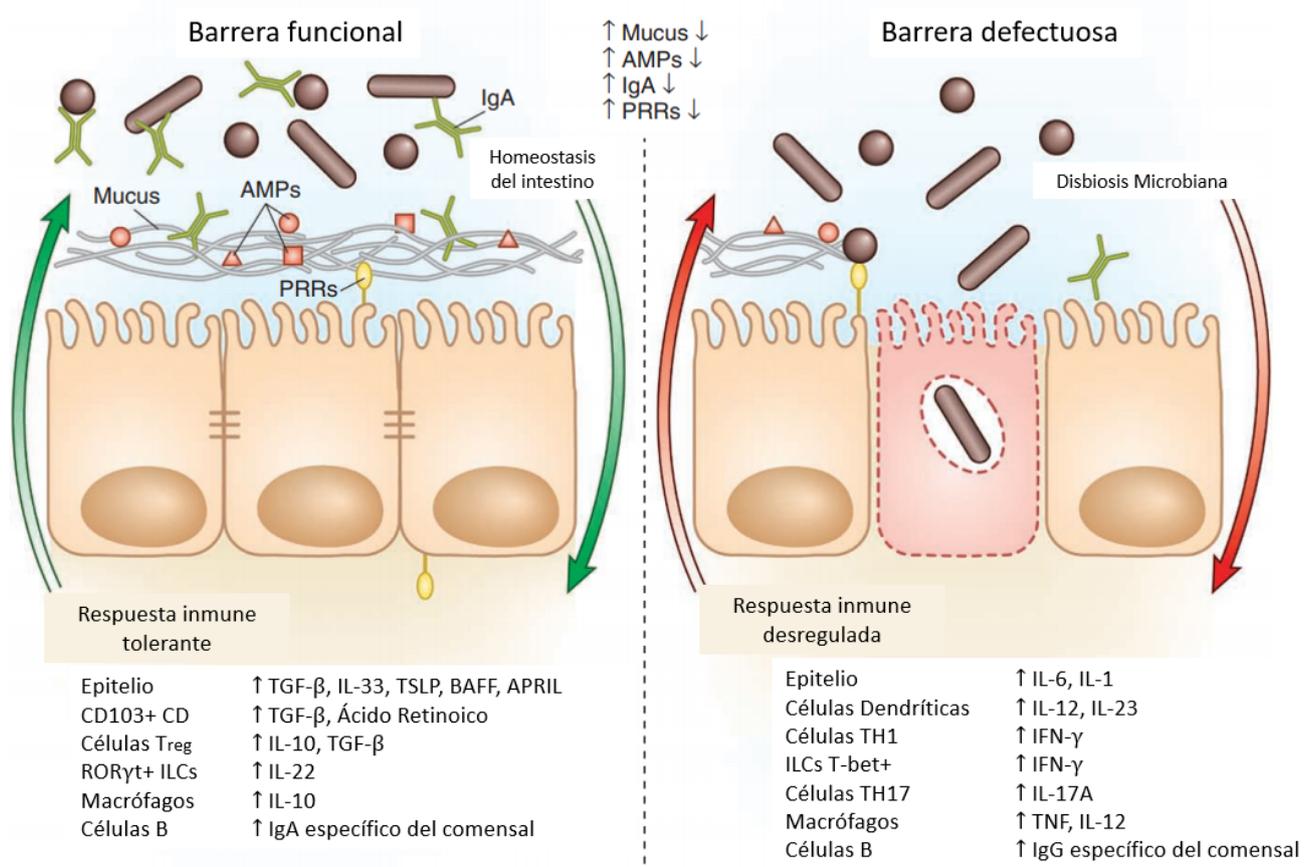


**Figura 62. Generación de células B IgA+ dependiente de células T en el GALT (Gut-associated lymphoid tissues).** En las placas de Peyer, las células dendríticas (CD) que engullen directa o indirectamente a las bacterias luminales producen IL-6 y se mueven del SED (Subepithelial dome) al IFR (Interfollicular regions) donde preparan a las células T CD4+ para generar células T ayudadoras foliculares (Tfh) que derivan de Treg y Th17. Las células Tfh se mueven hacia el folículo, donde interactúan con las células B IgM+ de forma análoga (MHC-TCR y CD40-CD40L). Además, Tip-CD induce la expresión del receptor de TGF- $\beta$  a través de la producción de óxido nítrico (NO). Posteriormente, las células B se diferencian en células B IgA+ a través de la expresión de AID en respuesta a TGF- $\beta$ , IL-21 (producidas por las células Tfh) y ácido retinoico "AR" (producido por las células dendríticas). Las células B IgA+ migran a la lámina propia intestinal, donde se diferenciarán a células plasmáticas productoras de IgA. *Modificada de la figura en Tezuka & Ohteki (2019).*



**Figura 63. Generación de células B IgA+ independiente de células T en el GALT (Gut-associated lymphoid tissues).** En los folículos linfoides aislados, las células dendríticas (CD) que toman muestras de bacterias luminales producen TGF-β. Las CD también producen BAFF y APRIL para generar células B IgA+ que se alojan en la lámina propia y se diferencian en células plasmáticas productoras de IgA (CP). En la lámina propia, CD103+ cCD2 que muestrean las bacterias luminales, producen IL-6 y ácido retinoico (AR). Las células CX3CR1+ producen BAFF y APRIL en respuesta al óxido nítrico (NO, producido por la CD-Tip y CP) y TSLP [producido por células epiteliales intestinales (CEI)]. Las ILCs RORγt+ inducen CD-Tip de forma dependiente de LTα1β2, que producen BAFF y APRIL por pCD. En presencia de BAFF/APRIL, AR e IL-6, las células B IgM+ generan células B IgA+, que se diferenciarán en células plasmáticas (CP) productoras de IgA. *Modificada de la figura en Tezuka & Ohteki (2019).*

Por todo lo indicado hasta ahora, resulta claro que el sistema inmunitario intestinal se ha especializado en el control la distribución espacial del microbiota a través del reconocimiento de moléculas del microbiota con la finalidad de mantener la homeostasis. Sin embargo, la homeostasis puede resultar alterada tras la ingestión gastrointestinal de patógenos. La respuesta inmunitaria frente al patógeno puede producir efectos colaterales tales como el daño de tejidos y la alteración de la composición del microbiota. A veces, una fuerte respuesta proinflamatoria puede romper la barrera intestinal, lo que va a favorecer la eficiencia de colonización y la supervivencia del patógeno (Fig. 64).



**Figura 64. Las barreras innatas garantizan una respuesta tolerante al microbiota.** La presencia de una barrera funcional, con cantidades normales de PRRs, mucus, AMPs e IgA secretada, promueve la homeostasis intestinal con el microbiota. En situaciones de inmunodeficiencia o síndromes inflamatorios con un defecto en la barrera innata (por ejemplo, IBD, CVID o infección por HIV), el sistema inmunitario intestinal dirige una respuesta dañina proinflamatoria al microbiota para eliminar a la bacteria invasora, y se produce una desregulación del microbiota (disbiosis). *Modificada de la figura en Brown et al (2013).*

Entender cómo un consorcio tan diverso de bacterias interacciona con el sistema inmunitario en un ambiente cambiante como es el intestino está fuera de nuestro conocimiento actual. Sería deseable identificar marcadores de una correcta interacción, tal como metabolitos, que nos ayuden a diseñar métodos terapéuticos para restablecer un adecuado equilibrio entre el microbiota y la respuesta inmunitaria local, roto en procesos inmunopatológicos o tras infecciones con microorganismos patogénicos.

## REFERENCIAS.

- **Alekshun, M.N., and Levy, S.B.** (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128: 1037-1050.
- **Andersson, D.I. and Hughes, D.** (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 12: 465-478.
- **Bergsbaken, T., Fink, S.L., and Cookson, B.T.** (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 7: 99-109.
- **Biswas, S. and Rolain, J.M.** (2013). Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *J Microbiol Methods* 92: 14-24.
- **Boers S.A. , R. J.** (2019). Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 1059-1070.
- **Brown, E.M., Sadarangani, M. and Finlay, B.B.** (2013). The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat Immunol* 14: 660-667.
- **Broz, P. and Monack, D.M.** (2011). Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunol Rev* 243: 174-190.
- **Buchan, B.W. and Ledebor, N.A.** (2014). Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 27: 783-822.
- **Casadevall, A. and Pirofski, L.-A.** (2000) Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.* 68: 6511-6518.
- **Drakesmith, H., & Prentice, A. M.** (2012). Hepcidin and the iron-infection axis. *Science.* 338(6108), 768–772.
- **Gekenedis M, P. S. (2014).** Beyond the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Biotyping Workflow: in Search of Microorganism-Specific Tryptic Peptides Enabling Discrimination of Subspecies. *Appl Environ Microbiol*, 4234-4241.
- **Gensollen, T. and Blumberg, RS.** (2017). Correlation between early-life regulation of the immune system by microbiota and allergy development. *J Allergy Clin Immunol* 139(4):1084-1091.
- **Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R. and Haldar, J.** (2019). Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol* 27: 323–338.
- **Harms, A., Maisonneuve, E. and Gerdes, K.** (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 354: aaf4268.
- **Hayward, J.A., Mathur, A., Ngo, C. and Man, S.M.** (2018). Cytosolic Recognition of Microbes and Pathogens: Inflammasomes in Action. *Microbiol Mol Biol Rev* 82: e00015.
- **Hollenbeck, B.L. and Rice, L.B.** (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* 3: 421-433.
- **Honda, K. and Littman, D. R.** (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*, 535(7610): 75–84.
- **Hood, M.I. and Skaar, E.P.** (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* 10: 525-537.
- **Hughes, D.** (2003). Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. *Nat Rev Genet* 4: 432-441.
- **Kamada, N., Chen, G.Y., Inohara, N. and Nuñez, G.** (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* 14: 685-690.
- **Kim, S., Covington, A. and Pamer, EG. (2017).** The intestinal microbiota: antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev* 279(1):90-105.
- **Lepanto, M. S., Rosa, L., Paesano, R., Valenti, P., & Cutone, A.** (2019). Lactoferrin in Aseptic and Septic Inflammation. *Molecules.* 24(7), 1323.
- **Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J.** (1998) *Biología de los microorganismos* (8ª Ed.) Prentice Hall Iberia, Madrid. Cap. 21, 865-901.
- **Mao X, C. L.** (2019). Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *Am J Transl Res*, 7209-7222.
- **Martinez, J. L. and Baquero, F.** (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 15: 647-679.

- **Niu, Q., Li, S., Chen, D., Chen, Q., & Chen, J.** (2016). Iron acquisition in Leishmania and its crucial role in infection. *Parasitol* 143(11), 1347–1357.
- **Palmer, L.D. and Skaar, E.P.** (2016). Transition Metals and Virulence in Bacteria. *Annu Rev Genet* 50: 67–91.
- **Parrow, N.L., Fleming, R.E. and Minnick, M.F.** (2013). Sequestration and scavenging of iron in infection. *Infect Immun* 81: 3503-3514.
- **Prasetyoputri, A., Jarrad, A.M., Cooper, M.A. y Blaskovich, M.A.T.** (2019). The Eagle Effect and Antibiotic-Induced Persistence: Two Sides of the Same Coin?. *Trends Microbiol* 27(4): 339-354.
- **Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R. and Haldar, J.** (2019). Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol* 27: 323–338.
- **Seo, G., Giles, DA. and Kronenberg, M.** (2020). The role of innate lymphoid cells in response to microbes at mucosal surfaces. *Mucosal Immunol* 13(3):399-412.
- **Sheldon, JR. and Skaar, EP.** (2019). Metals as phagocyte antimicrobial effectors. *Curr Opin Immunol* 60:1-9.
- **Soares, M.P. and Weiss, G.** (2015). The Iron age of host-microbe interactions. *EMBO Rep* 16: 1482-1500.
- **Tezuka, H. and Ohteki, T.** (2019). Regulation of IgA Production by Intestinal Dendritic Cells and Related Cells. *Front Immunol* 10:1891.
- **Walsh, C.** (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406: 775-781.
- **Willing, B.P., Russell, S.L. and Finlay, B.B.** (2011). Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nat Rev Microbiol* 9: 233-243.
- **Wright, G.D.** (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* 5: 175-186.
- **Yan L, J. Z.** (2014). Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Mol BioSyst*; 970-1003.
- **Wright, G.D.** (2016). Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends Microbiol* 24(11): 862-871,

#### En la red:

- <http://www.lib.uiowa.edu/hardin/md/micro.html> [Esta página incluye un gran directorio de páginas de Microbiología y Enfermedades Infecciosas]
- [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf) [Discurso de Alexander Fleming pronunciado en la recepción del premio Nobel en 1945]
- <https://www.healthychildren.org/Spanish/health-issues/conditions/treatments/Paginas/The-History-of-Antibiotics.aspx> [Historia del descubrimiento de la Penicilina]
- <https://www.institutoorl-iom.com/amigdalitis-2/> [Instituto de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello de Madrid. Amigdalitis: síntomas, causas y tratamientos frecuentes. 2017]
- [https://resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/informe\\_jiacra-espana.pdf?file=1&type=node&id=410&force=0](https://resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/informe_jiacra-espana.pdf?file=1&type=node&id=410&force=0) [Plan Nacional Resistencia Antibióticos. Informe JIACRA España 2018]
- [https://elpais.com/elpais/2018/05/21/ciencia/1526897155\\_270336.html](https://elpais.com/elpais/2018/05/21/ciencia/1526897155_270336.html)[La verdadera historia del paciente tratado con penicilina. Noticia de El País.]
- Imagen grupo hemo: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1904\\_Hemoglobin.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1904_Hemoglobin.jpg)