



FACULTAD DE
CIENCIAS

Microbiología Clínica

Grado de Bioquímica

Departamento de Biología Molecular

U.A.M. © 2015



TEMA 8: INTRODUCCIÓN A LA BACTERIOLOGÍA CLÍNICA

AUTORES

Alba Álvarez Cueto
Alicia Belmonte Alfaro
Silvia Campanario Sanz
Daniele Dal Pan Chirino
Luisa Demarchi
Raquel Felipe Mendía
Alba Velasco Trujillo

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. Conceptos y definiciones. | 6 |
| 1.1. Infección. | 6 |
| 1.1.1. Colonización. | 6 |
| 1.1.2. Infección inaparente. | 6 |
| 1.1.3. Enfermedad infecciosa. | 6 |
| 1.2. Epidemiología. | 7 |
| 1.2.1. Terminología epidemiológica | 7 |
| 1.3. Modulación de las comunidades microbianas | 8 |
| 1.3.1. Probióticos | 8 |
| 1.3.2. Prebióticos | 8 |
| 2. Patogenicidad. | 9 |
| 2.1. Determinantes extracromosomales de patogenicidad | 10 |
| 2.2. Genes antivirulencia. | 11 |
| 3. Estrategias para una adaptación microambiental rápida | 13 |
| 3.1. Variación genética frente a regulación génica. | 13 |
| 4. Diagnóstico | 14 |
| 4.1. Aplicación de las nuevas tecnologías al diagnóstico en el laboratorio de microbiología clínica. | 15 |
| 4.1.1. Métodos de diagnóstico basados en la amplificación específica de secuencias. | 17 |
| 4.1.2. Métodos de diagnóstico basados en "microarrays" | 22 |
| 4.1.3. PCR digital | 26 |
| 4.1.4. Métodos basados en la secuenciación de ácidos nucleicos. | 28 |
| 4.1.5. Métodos basados en la espectrometría de masas. | 29 |
| 5. Antibióticos | 32 |
| 5.1. Los antibióticos y el microbiota. | 36 |
| 5.2. Características generales de los antibióticos. | 42 |
| 5.3. Blancos para las principales clases de drogas antibacterianas. | 45 |
| 5.3.1. Biosíntesis de la pared celular. | 45 |
| 5.3.2. Síntesis de proteínas. | 47 |
| 5.3.3. Replicación y reparación del DNA. | 48 |
| 5.4. Estrategias de las bacterias para neutralizar la acción de los antibióticos. | 49 |
| 5.4.1. Bombeo hacia fuera de antibióticos. | 51 |
| 5.4.2. Destrucción del antibiótico. | 52 |
| 5.4.3. Introducción de cambios en la estructura de la molécula blanco. | 53 |
| 5.5. Desarrollo de nuevas drogas que eviten la resistencia. | 56 |
| 5.6. Origen y evolución de los genes de resistencia. | 57 |
| 6. La piroptosis: mecanismo de defensa frente a la infección | 58 |
| 7. Inmunidad frente a los patógenos a través de la limitación nutricional | 64 |
| 8. Relación entre el sistema inmunitario y la flora intestinal | 74 |

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. Se piensa que esta coexistencia hospedador-microorganismos, comienza tras el nacimiento, y que la mayoría de estos comensales tienen naturaleza anaerobia.

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 procariotas? Quizás nosotros seamos las “patas” de una macrocolonia de bacterias. Para designar a un organismo multicelular complejo y todos sus microorganismos asociados se ha generado el término “holobionte”. Los animales y plantas ya no se consideran tanto entidades autónomas sino redes biomoleculares determinadas por un “hologenoma” que incluye tanto el del hospedador, como el del microbioma simbiote. Esta consideración de un organismo conjunto viene dada tras observar que las interacciones entre el hospedador y la microbiota son más de tipo genómico-genómico que genómico-ambiental.

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. Otros, facilitan la digestión de ciertos nutrientes, lo que a su vez favorecerá el establecimiento de relaciones de comensalismo en el sistema gastro-intestinal con ciertas colonias de microorganismos frente a otras. La combinación del hospedador con la microbiota, aumenta las posibilidades catalíticas del holobionte, lo que desempeña un importante papel en la fisiología del organismo.

Estas comunidades microbianas colonizan cualquier superficie expuesta con el entorno, e incluyen bacterias y virus. Cuando el balance de la microbiota se altera, se puede generar un estado de disbiosis, que desencadena un desajuste de los nichos de microorganismos, que puede perjudicar algunos de las cepas beneficiosas menos representadas, y conducir a un estado patológico del organismo (Fig. 1). Las mayores alteraciones en las interacciones entre poblaciones microbianas, vienen dadas por la dieta y el tratamiento con antibióticos, pero factores como la localización geográfica, la edad, estado de inmunosupresión y los trasplantes de órganos también son determinantes.

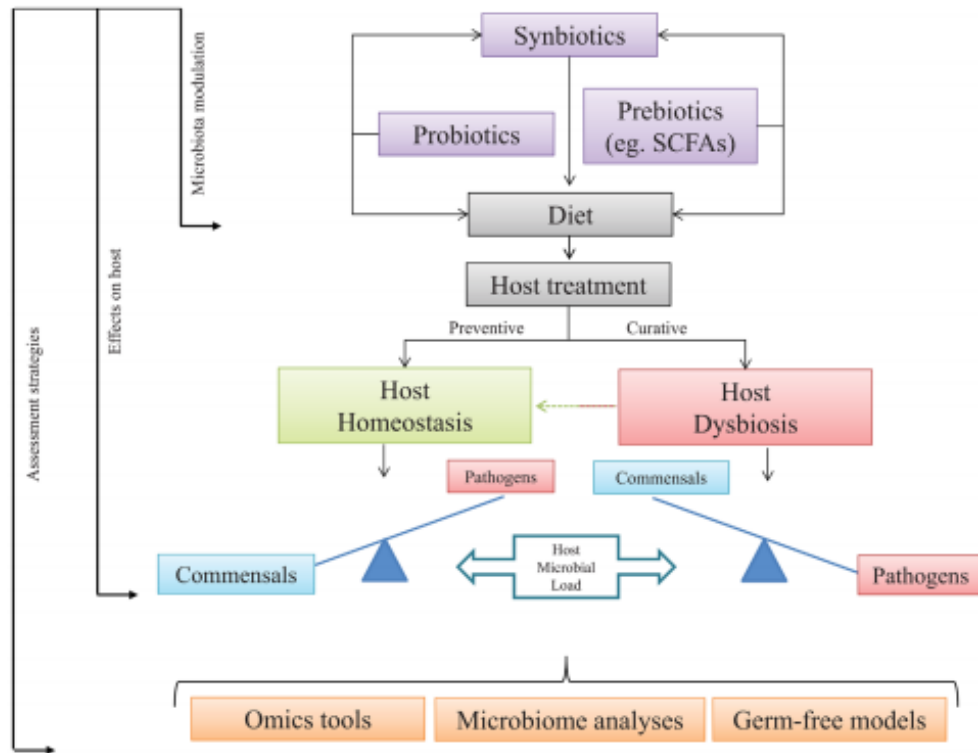


Fig. 1: Comparación de la carga microbiana bajo condiciones de salud y disbiosis. La adición exógena de suplementos dietéticos podría favorecer un estado saludable a través de un loop positivo entre el hospedador-microbioma. La microbiota comensal del intestino podría ser modulada por la suministración de microbios específicos, elementos no digeribles, o una mezcla de ambos. Se estima que el uso de pro-, pre- y sinbióticos respectivamente es capaz de restaurar el estado homeostático, pudiendo ser usados como estrategia preventiva o curativa. El seguimiento del proceso puede ser cuantificado, modelado y analizado usando herramientas ómicas, modelos libres de gérmenes y análisis de microbiomas. Ana Montalban-Arques et al (2015).

Aunque la variación natural de la microbiota humana no ha sido todavía determinada, sí existen evidencias que señalan que cambios en la estabilidad y dinámica de las comunidades microbianas están asociadas a múltiples enfermedades como la diabetes tipo II, la obesidad, la enfermedad inflamatoria del intestino, e incluso algunos tipos de cáncer. El estudio de patrones comunes de presencia microbiológica en los distintos nichos donde se asienta el microbioma humano, permiten categorizar a cada individuo según su enterotipo, es decir, el género bacteriano predominante y de mayor influencia (Fig. 2).

Sin embargo se necesita un estudio más profundo del campo para confirmar si la baja diversidad bacteriana aumentaría las probabilidades de dichas enfermedades y alteraciones metabólicas.

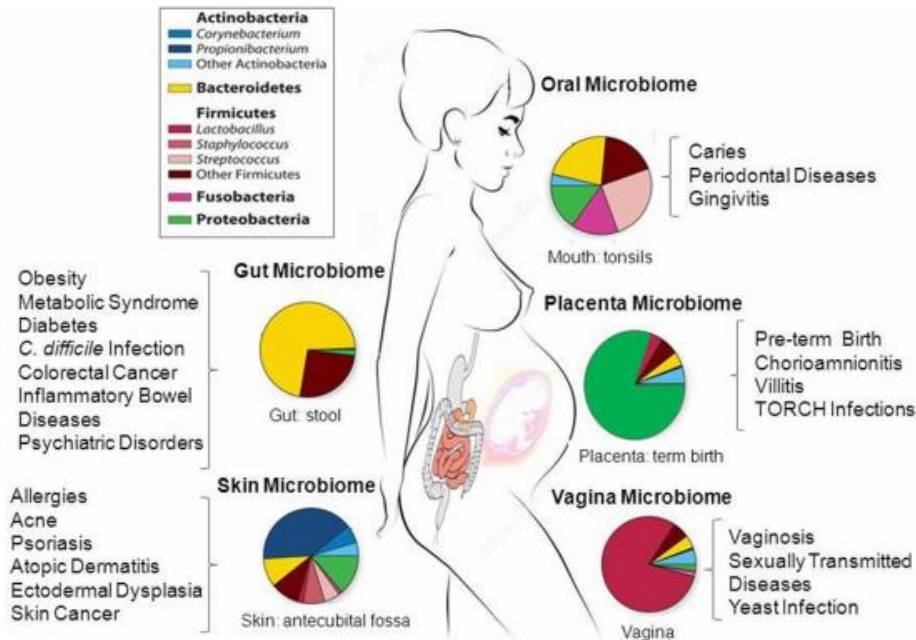


Fig. 2: Distribución taxonómica, prevalencia y abundancia de cada taxa microbiana que colonizan los distintos nichos humanos según el Proyecto de Microbioma Humano (HMP). La leyenda muestra los filum/clases y géneros por colores. Estudios clínicos del microbioma ayudan a dilucidar la relación entre microbios y una serie de condiciones patológicas, como se muestra en la figura (Belizario & Napolitano, 2015)

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.

Estudios en animales libres de gérmenes, han demostrado cómo estos organismos muestran deficiencias en las respuestas inmunitarias, una vasculatura intestinal reducida, el tejido linfoide asociado al sistema gastro-intestinal está subdesarrollado, y se observa un almacenamiento y procesamiento alterado de las grasas, entre otras alteraciones.

Por eso, en el último siglo ha prevalecido el estudio de la interacción microbiota-hospedador en una circunstancia determinada, frente a la diferenciación intrínseca de microorganismos patogénicos o no-patogénicos.

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.

El estudio de la incidencia, distribución y control de las enfermedades en las poblaciones, es el campo de la epidemiología.

1.2.1. Terminología epidemiológica.

Esta 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.

Se dice que la enfermedad es epidémica cuando ocurre a un mismo tiempo en un número inhabitualmente alto de individuos de una comunidad; una pandemia es una epidemia ampliamente distribuida. Por el contrario, 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.

1.3. Modulación de las comunidades microbianas

La microbiota comensal gastro-intestinal no permanece inalterada, sino que varía entre individuos, especies, circunstancias y estaciones. Además la toma de antibióticos y suplementos dietéticos modifican en gran escala su composición.

1.3.1. Probióticos

Este término fue inicialmente definido para referirse a los suplementos de la dieta con contenido microbiótico, que administrados en la cantidad adecuada, suponían una mejora en la salud del hospedador. Los géneros más conocidos con características probióticas son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque no son los únicos. Aunque los mecanismos por los que actúan en beneficio del hospedador no se conocen en profundidad, se ha observado que facilitan la normalización de la microbiota: dificultan la adhesión de patógenos en el epitelio, incremento de la producción de mucinas, refuerza la barrera mucosa, o modula el sistema inmune mediante inducción de respuestas mediadas por células del SI.

Un probiótico tiene que tener al menos las siguientes características: resistencia a los ácidos gástricos, ausencia de genes de resistencia a antibióticos transmisibles y evidencia de una modulación beneficiosa de la microbiota gastro-intestinal comensal (CGIM) y no toxicidad. Uno de los metabolitos más importantes producidos durante la fermentación de carbohidratos complejos por la CGIM son los SCFAs o ácidos grasos de cadena corta de fácil absorción (ej: acetato, propionato, butirato), que se han relacionado con procesos de diferenciación celular, apoptosis, metabolismo lipídico, producción de mucinas, etc. Además de ser fuente de energía para las células epiteliales, en mamíferos se ha observado que intervienen en procesos de estimulación del SI mejorando la función de los linfocitos, al ser reconocidos por receptores específicos acoplado a proteínas G.

1.3.2. Prebióticos

Se consideran prebióticos los ingredientes no-digeribles fermentados selectivamente por bacterias beneficiosas que permiten cambios en la composición y actividad de la microbiota gastro-intestinal, favoreciendo el crecimiento de ciertos grupos de CGIM lo que incrementa la liberación de metabolitos bacterianos que confieren beneficios para la salud del hospedador mientras que inhibe las bacterias patógenas en multiplicación. Los beneficios reconocidos engloban mejora de la integridad de la barrera gastro-intestinal, producción de mediadores anti-inflamatorios, reducir el colesterol en sangre, mejorar la digestión de alimentos, refuerzo de la barrera mucosa y el componente inmuno-celular. Algunos ejemplos de metabolitos que actúan como prebióticos son los fructanos de tipo inulina, fructooligosacáridos, galacto-oligosacáridos, xylo-oligosacáridos, lactulosa, y oligosacáridos de leche materna.

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:

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*).

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) y 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 pueden 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: transformación (captura de DNA presente en el medio), transducción mediada por fagos y conjugación (intercambio de DNA entre organismos).

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.

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 de 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, delecionado 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

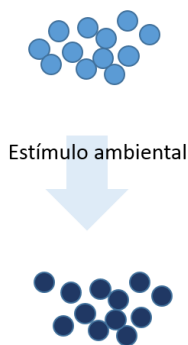
3.1. Variación genética frente a regulación génica.

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.

Regulación génica



Variación genética



Figura 3. Programas genéticos adaptativos. Dos tipos: variación geética, donde se forma una población heterogénea; o regulación génica, donde la población en este caso es homogénea.

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, es decir, responde a un menor número de cambios.

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

4. DIAGNÓSTICO

En esta figura 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. (Fig. 4).

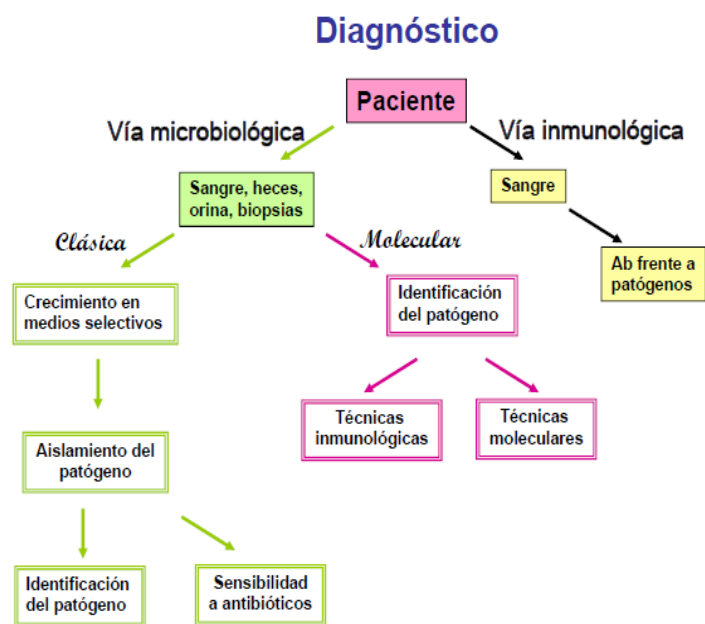


Figura 4. Métodos clínicos y diagnósticos usados en el aislamiento e identificación de patógenos.

Por lo tanto, una combinación de nuevas tecnologías y técnicas clásicas es fundamental para la correcta identificación de todos los microorganismos encontrados en el laboratorio. Esto apoya la necesidad de mantener las habilidades microbiológicas tradicionales.

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. Estas técnicas tienen la 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 niveles más altos de automatización de procesos preanalíticos y postanalíticos potencialmente pueden disminuir las habilidades del tecnólogo clínico por pérdida de familiaridad con habilidades y conceptos básicos, como prácticas de trabajo adecuadas para mitigar el riesgo de contaminación cuando se trabaja con ensayos moleculares.

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 ha 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.

Es importante ser consciente que estos enfoques sólo confirman la presencia de un ácido nucleico y no prueban la presencia 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.

La amplificación de ácidos nucleicos basados en la utilización de una polimerasa termoestable, PCR, 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.

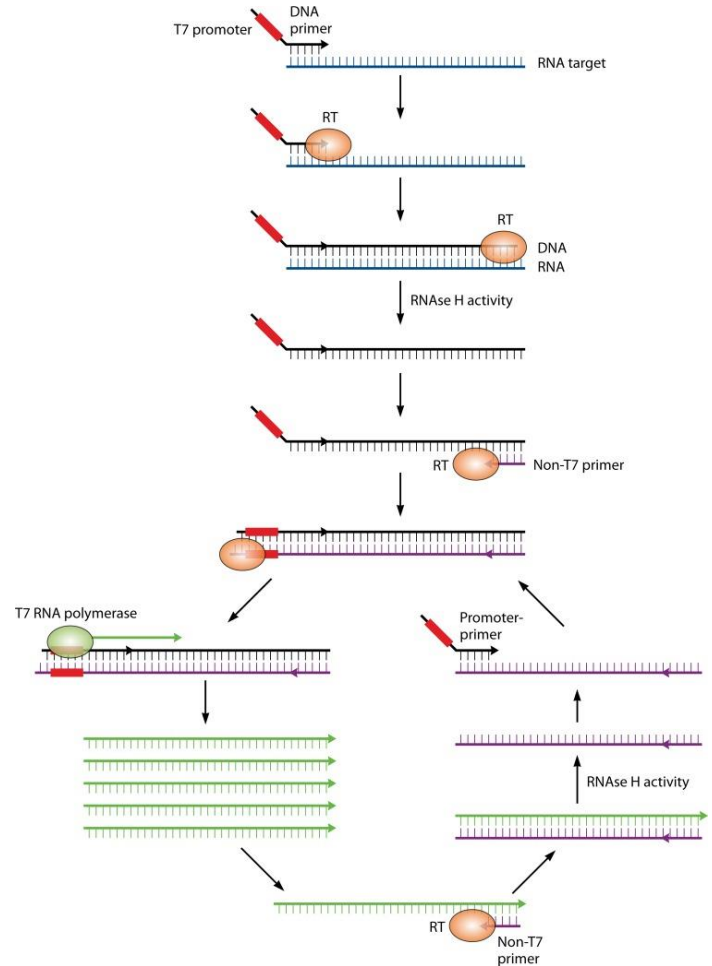
Además, en los laboratorios clínicos los procesos están altamente automatizados, lo que además disminuye grandemente la posibilidad de contaminación entre muestra, errores de pipeteo y otros errores preanalíticos atribuibles al error humano.

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”.

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. (Fig. 5).

La transcriptasa inversa y oligonucleótidos modificados se utilizan para generar simultáneamente una plantilla de ADNc e incorporar una secuencia de promotor reconocido por una enzima, ARN polimerasa del fago T7, altamente eficiente. Esta enzima permite la síntesis isotérmica de 100 a 1.000 ejemplares de cada ADNc molde de partida, que son a su vez utilizados como plantilla para las siguientes rondas de amplificación. La naturaleza multicopia de la diana de ARN y la capacidad de amplificar sin la necesidad de termociclador son ventajas de la técnica TMA.

Figura 5. Amplificación mediada por transcripción (TMA). El objetivo de ARN monocatenario está obligado por un cebador de ADNc por ingeniería genética para contener una secuencia promotora de ARN polimerasa T7 viral (recuadro rojo). La transcriptasa inversa (RT) se extiende el cebador de ADN para formar un RNA-cDNA duplex, y la cadena molde de ARN se degrada por la actividad RNasa H. Un segundo cebador hibrida con el ADNc monocatenario (negro) y se extiende mediante RT, que incorpora el promotor T7 en la secuencia de ADN de doble cadena. T ARN polimerasa reconoce la secuencia del promotor T7 incorporado y sintetiza 100 a 1000 copias de amplicón de ARN de una sola hebra (verde). Estos amplicones sere tanto como un objetivo para sondas de detección y como un molde de cadena sencilla para las siguientes rondas de amplificación utilizando el cebador no-T7 para iniciar la síntesis de ADNc mediante RT. (Bachun & Ledebor 2014).

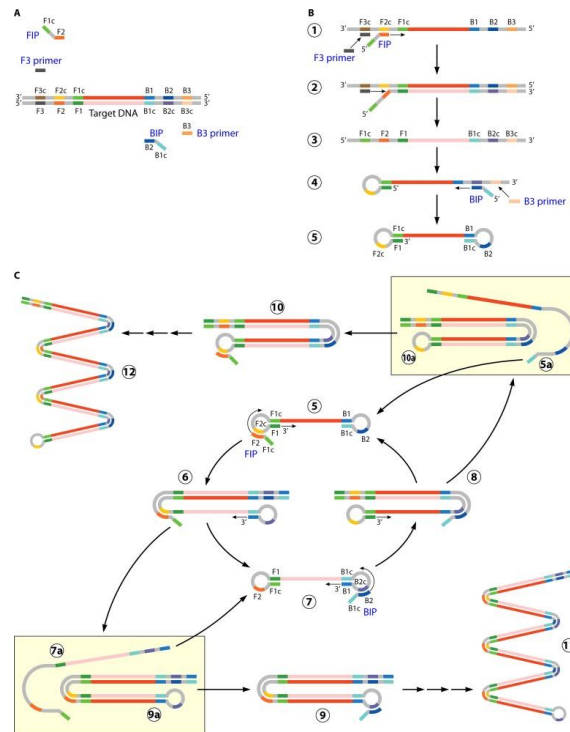


Un método que está alcanzando gran aceptación es la **amplificación isotérmica mediada por lazo** (LAMP, "loop-mediated isothermal amplification").

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 comienzan 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. 6).

Figura 6. Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).

(A) amplificación basada en-LAMP requiere 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 complementarias 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 "pesa de gimnasia". (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). (Buchan & Ledebor 2014).



El uso de 6 iniciadores y 4 sitios de reconocimiento proporciona especificidad mayor que la de PCR estándar que utilizan sólo 2 iniciadores. El aumento de la especificidad elimina la necesidad de costosas sondas marcadas con fluorescencia y sistemas de medida, y permite la detección del producto amplificado sobre la base de los subproductos de la replicación del ADN.

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.

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.

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. 7).

Como la LAMP, la amplificación isotérmica puede llevarse a cabo utilizando la instrumentación sencilla en ausencia de electricidad debido a una desnaturalización inicial a base de calor se requiere para una óptima eficiencia; sin embargo, la dependencia de una sola temperatura de reacción sin desnaturalización inicial mantiene 40 % a 60 % de eficiencia y es adecuada para generar amplicón suficiente para ensayos de detección de punto final.

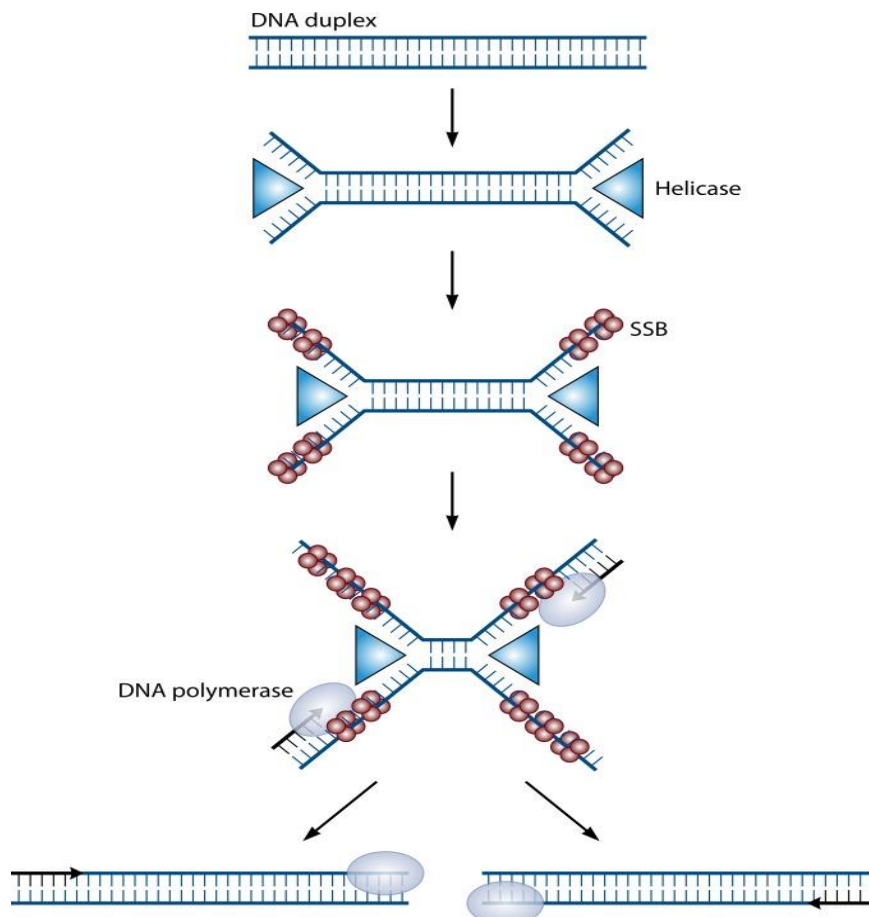


Figura 7. Amplificación dependiente de helicasa (HDA). HDA utiliza el UvrD (helicasa) (triángulos azules) y MutL (proteína accesoria requerida para la eficiente UvrD carga al ADN) enzimas de *E. coli* a la creación independiente de la temperatura catalasa de un molde de cadena sencilla de ADN para la amplificación de ácido nucleico. El complejo UvrD / MutL desenrolla proteínas de unión (SSB) (círculos rojos) se unen a la hebra desnaturalizado para evitar la asociación de las cadenas complementarias. Cebadores específicos están diseñados para hibridarse a la secuencia diana, y ADN polimerasa (óvalo gris) se extiende el cebador para generar amplicón objetivo. Este amplicón sirve como la plantilla para las siguientes rondas de amplificación. (Buchan & Ledebauer 2014)

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

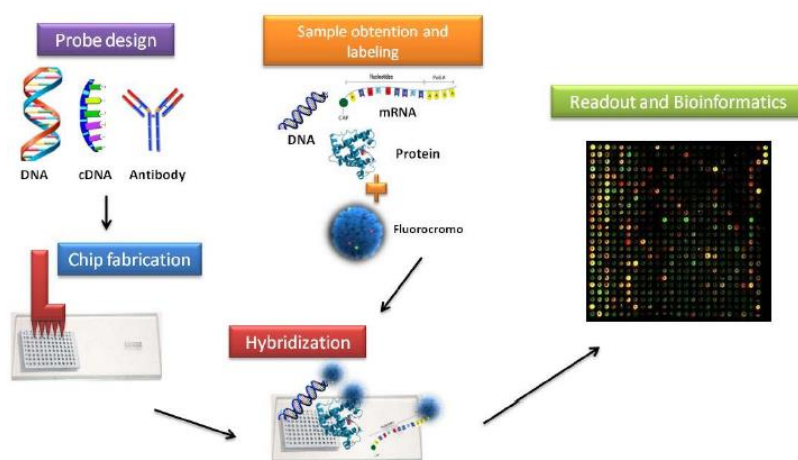
mucocutáneas, sin la necesidad de realizar una extracción previa de ácidos nucleicos y en tan solo 75 minutos.

HDA se ha aplicado a la identificación de *C. difficile*, *Plasmodium* spp. , Y *S. Aureus*. Una ventaja de HDA es que la detección del target se puede lograr mediante la incorporación de fluoresceína o digoxigenina en el amplicón, seguido de la captura y visualización del amplicón como una línea de color en un inmunoensayo enzimático (EIA) de tira de flujo lateral.

Métodos de amplificación isotérmica, incluyendo la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y la amplificación dependiente de helicasa (HDA), eliminan eficazmente la necesidad de termocicladores. Estos métodos se pueden acoplar a las tecnologías de detección alternativas (es decir, métodos de detección fluorescentes - sonda independiente) que eliminan la necesidad de óptica sofisticada. Esto reduce aún más el costo de la instrumentación y permite a estas pruebas ser utilizados fuera del "laboratorio molecular " y más cerca del punto de atención (POC).

4.1.2. Métodos de diagnóstico basados en “microarrays”

Métodos de diagnóstico basados en microarreglos (“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.

Microarrays son atractivos para el diagnóstico, ya que pueden reducir el costo y permitir la prueba simultánea de múltiples agentes patógenos asociados con síntomas similares.

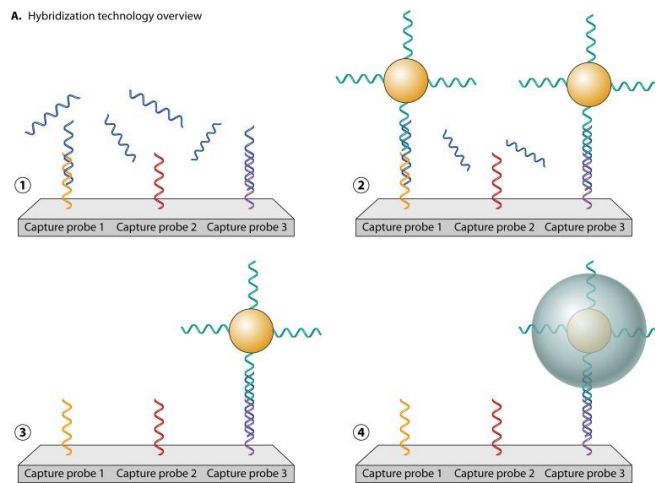
Los **microarrays clásicos** se basan en la utilización de oligonucleótidos sintéticos (sondas de captura) inmovilizados sobre una superficie sólida, que puede ser un portaobjetos de vidrio o una

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, que corresponde al sistema Verigen (Nanosphere, Northbrook, IL). (Fig. 8)

El sistema Verigen comercialmente disponible y aprobado por la FDA Nanosphere, Northbrook, IL) ofrece pruebas basadas en microarrays para la identificación de virus respiratorios (RV +), *C. difficile* (CDF), emocultivos que contienen bacterias Gram- positivas (BC- GP) o bacterias Gram-negativas (BC- GN), y la identificación de variantes genéticas, incluyendo el factor V Leiden y CYP450 2C19 * 2 y * 3, que afectan a pacientes con trastornos de la coagulación.

Un ejemplo de la tecnología de **microarrays en fase líquida** es el sistema xTAG (Luminex, Toronto, Canada)

A. Hybridization technology overview



B. Example array design

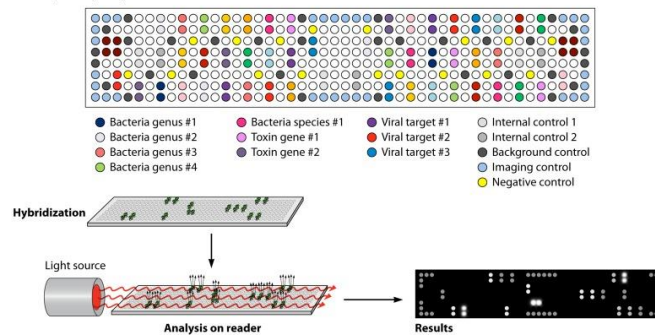


Figura 8. Verigene microarray en fase sólida. (A) de una sola hebra, sondas de captura específicas de la diana están dispuestos espacialmente y se inmovilizaron sobre la superficie del portaobjetos de vidrio. La diana de ácido nucleico (amplicón PCR o ácido nucleico extraído) se desnaturaliza y se aplica al portaobjetos de vidrio. Si está presente, el ácido nucleico diana se hibride con la sonda de captura complementaria. Microesfera de oro recubiertas con ácido nucleico monocatenario complementario a una región diferente de la secuencia diana añadió y recocido a la captura secuencia de sonda-diana híbrida para formar una estructura de ácido nucleico "sandwich". La matriz se lava para eliminar las micropartículas de ácidos nucleicos no unidos y oro. Aplicación de plata coloidal aumenta los tamaños de las microesferas destinada a aumentar la sensibilidad de detección. (B) sondas de captura-objetivo específico, además de los controles internos, son vistos por triplicado a diferentes lugares en el portaobjetos de vidrio para garantizar la coherencia de las etapas de recocido y de hibridación y aumentar la precisión de los resultados. Objetivo de detección se lleva a cabo utilizando una fuente de luz mostrado fuente a través del plano de la matriz. Si está presente, microesferas de plata unidos difractan la luz, que se detecta a continuación por una cámara óptica en el lector de matriz. (Buchan & Ledebor 2014).

Ejemplo de la tecnología de microarrays en fase líquida es el sistema xTAG (Luminex, Toronto, Canada)(Fig. 9)

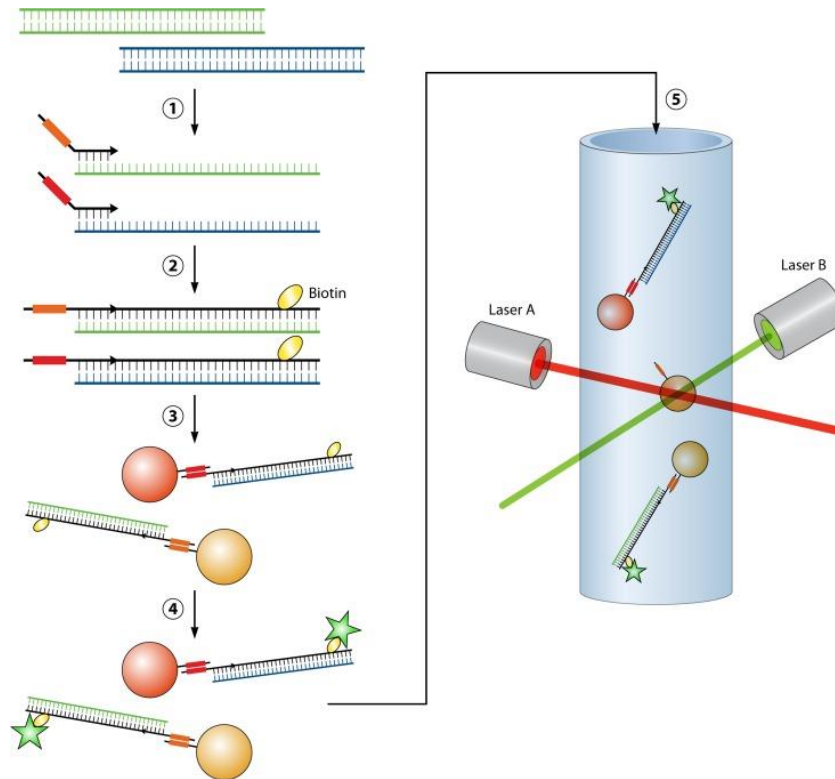


Figura 9. xTAG en fase líquida de microarrays. Las secuencias diana (azul y verde) se amplifican mediante PCR multiplex. Tras la amplificación, un segundo conjunto de cebadores específicos de la diana que contienen secuencias de etiqueta "universal" (cajas de color naranja y rojo) únicos para cada primer objetivo se utilizan para una reacción de extensión del cebador. Durante la extensión del cebador, un marcador de biotina se incorpora también en el amplicón. Amplicones marcados se incubaron a continuación con microperlas de poliestireno. Microbeads son únicamente de color, lo que permite la diferenciación de hasta 100 tipos diferentes de microesferas por el analizador. Cada perla color también está recubierta con hibridan con las microesferas que contienen el antitag. Además, se añade un conjugado de estreptavidina-fluoróforo (estrella verde) y se hibrida a amplicones marcados con biotina inmovilizados en las perlas. Siguiendo los pasos de hibridación, las perlas se analizan utilizando un clasificador de células equipado con dos láseres. El primero detecta la presencia del fluoróforo conjugado con biotina, que indica la presencia de un enlace a un amplicón microbead específico. El segundo láser interroga el talón para determinar qué colorante está presente, identificando de este modo el amplicón diana específico presente. El cordón central en el paso 5 carece de amplificación y por lo tanto sería negativo para la señal-biotina fluoróforo. Esta cuenta no sería analizada por el segundo láser. (Buchan & Ledebor 2014, Clin. Microbiol. Rev. 27:783-8484)

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.

Pocas evaluaciones clínicas del ensayo se han publicado, pero los informes iniciales demuestran sensibilidad y especificidad que van desde 82 a 100 % dependiendo del comparador que se usa como “estándar de oro”. Un gran número de estudios han evaluado el ensayo xTAG para patógenos respiratorios (xTAG RVP) , que detecta 12 a 19 virus (FDA) asociados con enfermedad respiratoria. Estos estudios han encontrado entre el 92 al 100 % de acuerdo con otras plataformas moleculares, y sensibilidades de 91 a 100 % con especificidades de > 99 %.

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.

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 “chips” que contienen 20000 pocillos individuales en los que la muestra es repartida ([Fig. 10](#)).

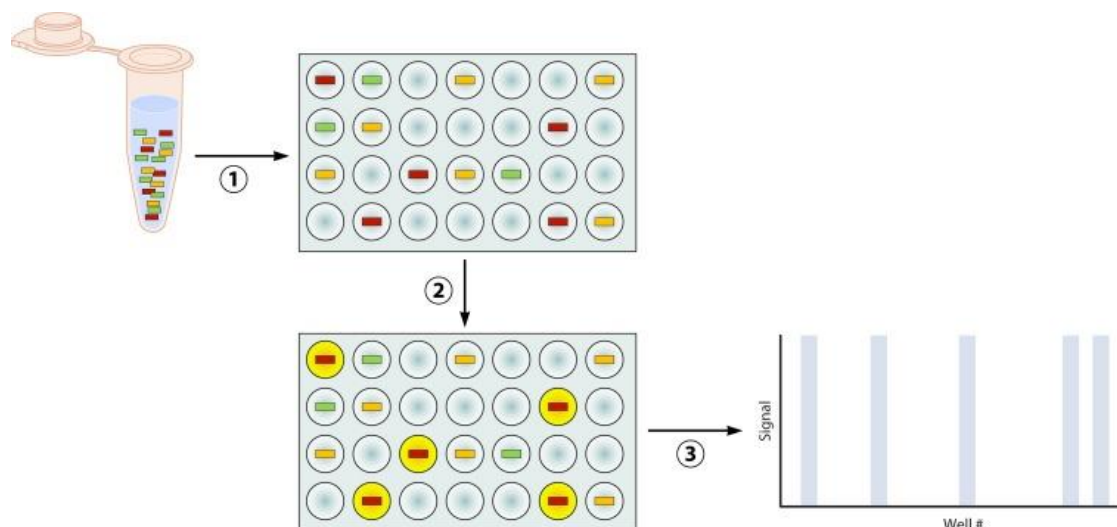


Figura 10: PCR digital. Una plantilla de ácido nucleico que contiene secuencias diana (cajas de color) en la muestra original se diluye en el bienestar individual micro (placa de PCR, en la foto) o gotas de picolitros (emulsión PCR) de tal manera que cada pocillo o una gotita contiene uno o cero copias de la secuencia diana. Después de la partición de la muestra, punto final de PCR se lleva a cabo y amplicón se detecta usando colorantes fluorescentes o sondas. Cada pocillo será ya sea positivo o negativo para la señal fluorescente en función de la presencia de la secuencia diana y amplicón resultante (círculos amarillos corresponden a barras azules en el gráfico). El número de pozos o gotitas positivos para la señal fluorescente (círculos amarillos) se corresponde directamente con el número de secuencias diana específicas (cajas rojas) presentes en la muestra original. (Buchan & Ledebor 2014)

Debido a la novedad de dPCR y relativamente reciente disponibilidad de sistemas fabricados comercialmente, hay pocas evaluaciones clínicas de esta tecnología. La mayoría de los estudios se han centrado en la detección y cuantificación de mutaciones en oncogenes. La PCR digital también se ha utilizado en enfermedades infecciosas para la detección de *S. aureus* y *C. trachomatis*, y se ha demostrado la capacidad de cuantificar con precisión virus de la hepatitis C (VHC) y cargas virales de VIH.

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 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.

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.

Otra desventaja: la mala calidad en los primeros 15 a 40 bases de la secuencia y el deterioro de la calidad de los datos de secuenciación después de 700 a 900 bases limitan su aplicabilidad a fragmentos de ADN relativamente cortas. Además, las reacciones de secuenciación de Sanger se limitan a análisis de la secuencia de un único amplicón por reacción.

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 desabsorción 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.

La base de MALDI- TOF es la espectrometría de masas. Un espectrómetro de masas se compone de tres componentes principales: una fuente de iones para ionizar moléculas de la muestra y los iones de transferencia en una fase gaseosa, un dispositivo analizador de masas que separan las moléculas en función de su masa y un detector para controlar todos los iones separados. Matrix - desorción láser asistida por ionización - tiempo de vuelo espectrometría de masas (MALDI -TOF MS) se refiere a la técnica de ionización suave utilizado en espectrometría de masas. MALDI se considera

que es una "técnica de ionización suave" 'porque despliega un pulso láser de nitrógeno corto, en lugar de láser continuo, para ionizar moléculas. Esta ionización "suave" significa que los iones formados tienen baja energía interna. Esto permite la observación de moléculas ionizadas con poca o ninguna fragmentación. (Fig. 11).

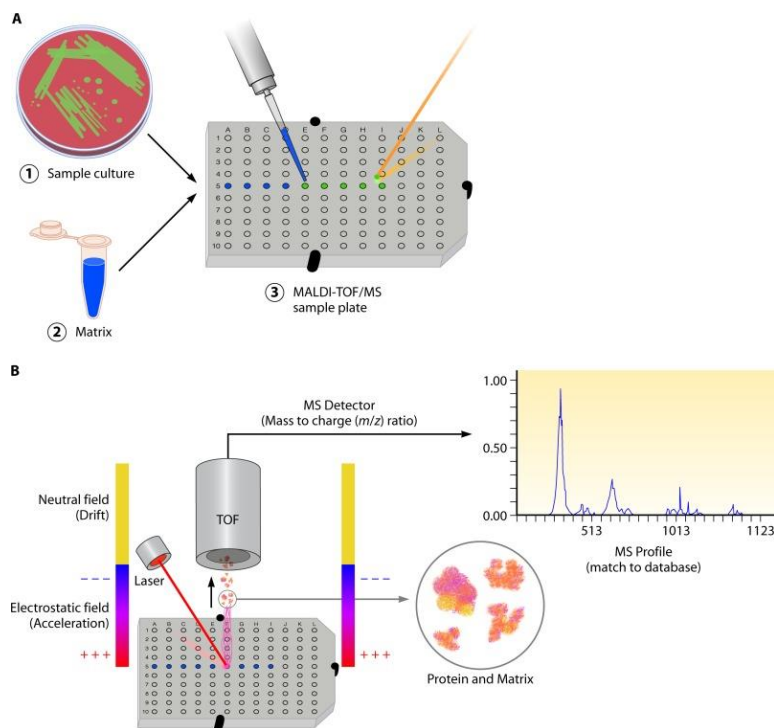


Figura 11. Matrix asistida por ionización por desorción láser tiempo de vuelo espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). (A) Preparación de muestras para el análisis por MALDI-TOF MS puede ser ya sea por transferencia directa de una colonia bacteriana a la placa de muestra usando un instrumento (manchas verdes) estériles o como un sobrenadante líquido después de un procedimiento de extracción (manchas azules). En cualquiera de los métodos, se permite que el analito que se seque antes de ser recubierto con un material de matriz de ácido débil. (B) Análisis del analito comienza con la exposición a un láser, que ioniza y desorbe analito a partir de la placa de muestra. Los iones son acelerados creados por el tiempo de vuelo tubo de vacío mediante la aplicación de un campo electrostático hasta que alcanzan el detector MS. Los iones con una relación de mayor masa-carga (m/z) se necesitará más tiempo para atravesar el momento de tubo de vuelo que los iones con una más pequeña m/z . (Buchan & Ledebor 2014).

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.

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. 11). 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)

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%.

La aplicación clínica de MALDI-TOF MS tradicionalmente se ha restringido a la identificación de colonias puras aisladas después del cultivo en medio sólido. Este es el resultado de dos limitaciones técnicas inherentes a la tecnología actual. El primero de ellos está relacionado con el límite de detección. A diferencia de los métodos moleculares de amplificación, MALDI-TOF MS se basa en el análisis de conjunto de células o muestras de proteínas extraídas. La generación de un perfil espectral adecuado requiere disponer de material suficiente. Los estudios para determinar la cantidad mínima de material celular o proteína extraída requerido para MALDI-TOF MS análisis han encontrado un mínimo de $1,5 \times 10^5$ UFC que se requiere para la identificación reproducible y precisa de los microorganismos. La segunda limitación es la incapacidad de software actual a separar múltiples espectros recogidos de forma simultánea, como ocurriría durante el análisis de cultivos mixtos o polimicrobianos.

5. ANTIBIÓTICOS

Aunque el término antibiótico podría incluir a cualquier sustancia con efectos frente a un organismo vivo, en realidad ha asado a ser un término utilizado para referirse a los fármacos con actividad antibacteriana. Los antibióticos se definen como medicamentos potentes que combaten las infecciones bacterianas. Su correcto uso puede salvar vidas y actúan matando las bacterias o impidiendo que se reproduzcan. Los antibióticos sin embargo no combaten las infecciones causadas por virus (resfriados, gripe...) y su uso contra este tipo de enfermedades, puede provocar más daños que beneficios.

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. Pero existen signos de que la fortaleza de las defensas construidas sobre los antibióticos se está desmoronando. 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. Este fenómeno que también podemos denominar como farmacorresistencia, resulta de gran preocupación dado que las infecciones por microorganismos resistentes pueden causar la muerte del paciente, transmitirse de unas personas a otras y generar elevados costes tanto

para el paciente como para la sociedad. Por ejemplo, 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. Asimismo, se ha comprobado en 10 países que las cefalosporinas de tercera generación, último recurso para el tratamiento de la gonorrea causada por la bacteria *Neisseria gonorrhoeae*, pueden ser ineficaces a causa de la resistencias bacterianas.

¿A qué puede ser debido el grave problema de resistencias a los antimicrobianos? (Fig 12).

- Es debido en gran parte al mal uso o abuso de los antibióticos, como por ejemplo, cuando se toman dosis insuficientes o no se finalizan los tratamientos prescritos.
- **Prescripciones erróneas y deficiencias de la prevención y control de las infecciones.** Los pacientes hospitalizados son unos de los principales reservorios de microorganismos resistentes y los pacientes portadores de estos últimos, pueden ser una fuente de infección de unos a otros.
- **Medicamentos de baja calidad.** En algunos países la falta de acceso a los antimicrobianos puede forzar a los pacientes a tomar tratamientos incompletos o buscar alternativas entre las que se puede encontrar medicamentos de baja calidad.
- **La ganadería es una fuente de resistencia a antibióticos.** En la ganadería se emplean dosis subterapéuticas de antibióticos para fomentar el crecimiento de los animales o prevenir enfermedades, y esto puede favorecer la aparición de microorganismos resistentes que se transmitan al hombre.
- **La debilidad de los sistemas de vigilancia contribuye a la farmacoresistencia.** Hay pocas redes que estén bien establecidas y sirvan de comunicación regular de datos sobre la farmacoresistencia. Algunos países carecen de laboratorios en los que se pueda identificar con exactitud la resistencia lo que dificulta la detección temprana y adopción de medidas pertinentes.

Figura 12. Principales motivos por lo que surge la resistencia a los anti-microbianos.

La OMS hace un llamamiento a la población en general, tanto profesionales como ciudadanos para que todos pongamos de nuestra mano con el fin de combatir esta amenaza para la salud pública. Fuente: **Organización Mundial de la Salud (OMS).**

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 y otras enfermedades víricas. 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 drogas.

Para lograr que los pacientes estén informados de tomar las dosis correctas de los antimicrobianos apropiadas, es fundamental la intervención de los profesionales que prescriben, de



los farmacéuticos y dispensadores, de la industria farmacéutica y de la población en general. La OMS pide a todas las partes interesadas que participen en la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos. En la 68.^a Asamblea Mundial de la Salud celebrada en mayo de 2015, la OMS formuló un plan de acción mundial para luchar contra la resistencia a los antimicrobianos. Por consiguiente, aquellos gobiernos que aprueben el plan, deben manifestar su disposición a luchar contra esta amenaza para la salud mundial.

Las primeras investigaciones sobre la susceptibilidad bacteriana ante la dosis de antibióticos introdujo uno de los principales conceptos en la microbiología clínica: la concentración mínima inhibitoria (MIC), que se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. Este concepto resulta importante en la evaluación de nuevos agentes antimicrobianos para medir su actividad.

Uso de antibióticos en humanos y ganado. (Fig 13). Cuando los antibióticos son clínicamente usados, el primer objetivo es lograr la máxima concentración no tóxica para obtener la mayor proporción de cura y prevenir la resistencia de novo en el hospedador al haber acabado por completo con la infección. Sin embargo, este objetivo no se alcanza pues las concentraciones de antibióticos resultan estar por debajo de la MIC, (sub-MIC) en distintos compartimientos y tejidos del cuerpo, de manera que la infección se combate débilmente. Los motivos por los que no se llega a alcanzar la concentración necesaria son varios: farmacocinética pobre (lo que influye en la baja distribución y penetración en los distintos tejidos), el uso de medicamentos de baja actividad y la falta del cumplimiento del paciente.

La utilización de antibióticos en los alimentos para animales (Fig 13) es indudablemente otro factor que contribuye a aumentar el problema de resistencia a drogas. La adición 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). Sin embargo, los antibióticos se administran en bajos niveles y a largo plazo, denominados sub-MIC (o cantidades subclínicas) con el fin de obtener beneficios. Así, las cantidades de antibióticos utilizados para la salud animal son enormes si se compara con el consumo en humanos. Por ejemplo, durante 1994 en Dinamarca, se utilizaron 24.000 Kg de un derivado de vancomicina (llamado avoparcina) para el cuidado animal mientras que sólo se emplearon 24 Kg de vancomicina para tratar infecciones humanas en ese mismo año. Esta práctica conduce a un aumento en el número de bacterias resistentes en estos animales. Existen evidencias del paso de bacterias resistentes como *Salmonella* desde animales a las poblaciones humanas.

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 polución 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 13).

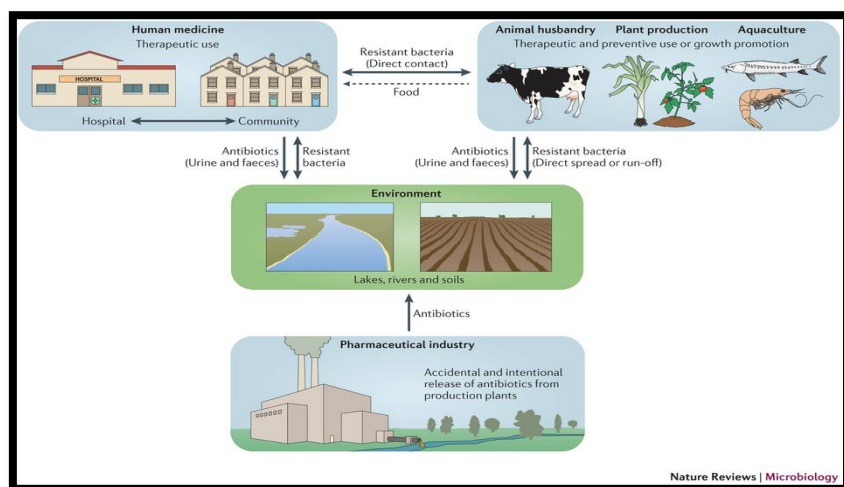


Figura 13. Ecología de los antibióticos y resistencia a antibióticos. Los antibióticos son producidos por bacterias y hongos desde hace millones de años. Además, durante los últimos 70 años aproximadamente, los humanos hemos producido y acumulado grandes cantidades de agentes antimicrobianos, bien con fines medicinales, granjas, acuicultura y agriculturas. Existe por tanto, un elevado porcentaje de antibióticos que se liberan de manera directa al medio, bien por heces u orina como también, de manera intencionada o accidental en la industria farmacéutica además de la producción natural por parte de bacterias y hongos. 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. **Andersson & Hughes (2014)**

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.

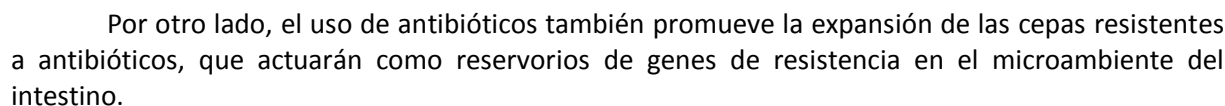
El microbiota protege al hospedador de patógenos invasores a través de varios mecanismos, que incluyen competición por el espacio y los sitios de unión, competición por nutrientes e inhibición directa mediante la liberación de moléculas inhibidoras.

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.

Los antibióticos también sirven como herramientas para estudiar el papel que desempeña la microbiota en la protección y su contribución en enfermedades intestinal y extra-intestinales. A través del estudio con ratones experimentales, se llegó a comprender que la depleción de la microbiota no sólo tiene efectos a nivel del intestino, sino también a nivel extraintestinal. El tratamiento con antibióticos administrados vía oral y que ejercen un efecto sobre la microbiota, se ha asociado con enfermedades como CDAD, diarrea por *Clostridium difficile*, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, entre otras (Fig. 14).

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. Asimismo, la alteración en la microbiota supone

Figura 14. Asociación entre antibióticos administrados vía oral y enfermedades intestinales y extra-intestinales. Muchas de las asociaciones se han descrito por estudios clínicos mientras que otras a través de modelos experimentales. Ejemplos son CDAD, Diarrea por *Clostridium difficile*; EAE, autoinmunidad encefalopática experimental; T1D, diabetes tipo 1; T2D, diabetes tipo 2; Autismo. **Willing et al (2011)**



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 biliar. Es decir, fármacos en circulación sistémica cuando llegan al hígado donde van a ser metabolizados, pueden en parte volver a la circulación sistémica como también, ser secretados a través de la bilis. Esto tiene como consecuencia efectos negativos sobre la microbiota intestinal dado que fármacos activos podrán ejercer su efecto en esta región.

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. La interacción entre microorganismo y su hospedador es sorprendentemente específica donde ambas especies han coevolucionado a lo largo de la historia. Esta interacción puede ser en parte alterada o perdida por completo como consecuencia del tratamiento con antibióticos, conduciendo a efectos perjudiciales para salud.

Los antibióticos tienen efectos directos e indirectos sobre el microbiota intestinal (Fig. 15). Existen relaciones de mutualismo entre los microorganismos del intestino y el hospedador, dándose co-dependencia 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_2 , 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.

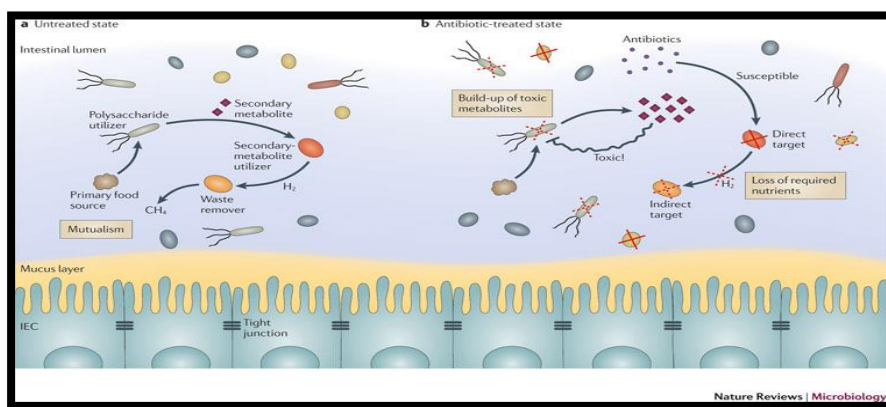


Figura 15. Los antibióticos tienen un efecto directo e indirecto sobre la microbiota intestinal. (a) Mutualismo existente entre los simbioses intestinales y las células del huésped en ausencia del antibiótico, y alteración del mismo en presencia de un antibiótico. Un polisacárido presente en los alimentos ingeridos puede ser utilizado como fuente de energía para producir una serie de metabolitos secundarios que a su vez, serán empleados por otras especies simbiotas vecinas y que producirán sustancias desecho, las cuales serán eliminadas por otras especies de la microbiota. (b) La ingesta de antibióticos provoca una alteración en el mutualismo existente, lo que conlleva a una acumulación de metabolitos secundarios que pueden ser tóxicos por el propio microorganismo como también, escasez de nutrientes para las bacterias competentes en eliminar los productos de desecho. un mutualismo entre simbioses del intestino y el hospedador en ausencia de antibióticos. **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. Numerosos estudios describen el butirato como una molécula anti-inflamatoria en el intestino. Por ejemplo, se ha visto que inhibe la expresión constitutiva de MPC1 (proteína quimioatrayente de monocitos o CCL2) y además reduce la producción por parte de neutrófilos de especies reactivas del oxígeno. Estas propiedades antiinflamatorias son generalmente consideradas beneficiosas.

Otra característica del uso de antibióticos, es la pérdida específica de señalización bacteriana. La depleción de la microbiota intestinal como consecuencia del uso de antibióticos, conlleva, a su vez, la pérdida de señales asociadas a estas bacterias. Un ejemplo aunque aún no está del otro claro se ha visto en bacterias filamentosas segmentadas (SFB), importante miembro de la microbiota en el intestino que está adaptada con el organismo huésped de tal manera que induce la diferenciación de

linfocitos T helper 17 (T_H17). El uso de antibióticos como vancomicina se ha asociado con la eliminación de esta señalización y, por consiguiente, la disminución de linfocitos T helper 17.

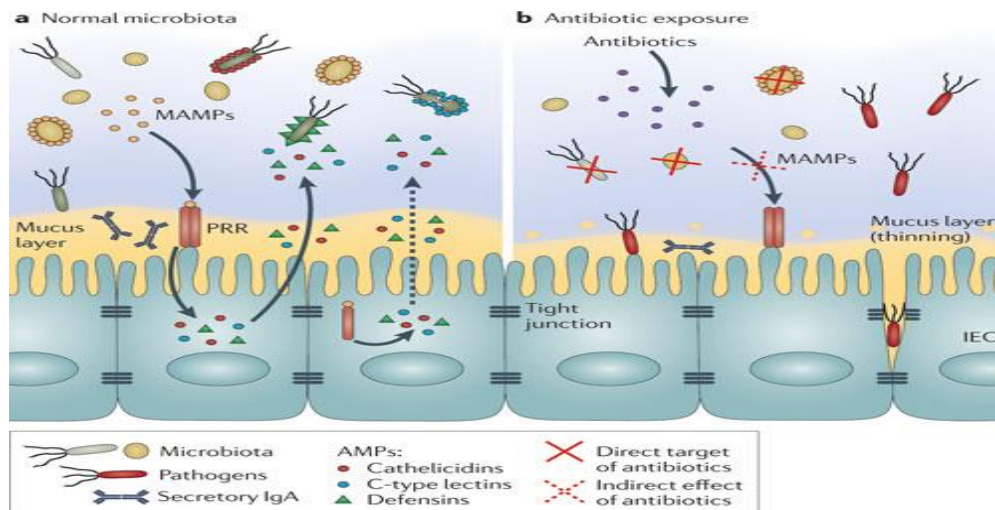
Por otro lado, los antibióticos de forma indirecta van a afectar al sistema inmunitario. Un mecanismo importante por el que el microbiota afecta al sistema inmunitario del hospedador es a través de la activación de los receptores que reconocen los MAMP (“microorganism-associated molecular pattern”), 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.

| Antibiótico | Efecto en la microbiota | Efecto en el sistema inmune |
|---|---|---|
| Amoxicilina | <ul style="list-style-type: none"> • Cambios en la composición del microbiota • Depleción de lactobacillus. | <ul style="list-style-type: none"> • Reducción de las defensas antimicrobicas. • Reducción de la expresión de moléculas MHC (células presentadoras de antígenos). |
| Ampicilina o Vancomicina | <ul style="list-style-type: none"> • Depleción de bacterias gran positiva. • Depleción de SFB. | <ul style="list-style-type: none"> • Depleción de linfocitos T 17 helper. |
| Amoxicilina y ácido clavulánico. | <ul style="list-style-type: none"> • Cambio no determinado en la microbiota. | <ul style="list-style-type: none"> • Reducción sistémica de IgG. |

Tabla 1. Ejemplos de antibióticos asociados con cambios en la inmunidad. Willing et al (2011)

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 MAMPs, 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.



Nature Reviews | Microbiology

Figura 16. Homeostasis epitelial en ausencia y pérdida de la homeostasis en presencia de antibióticos. (a) En ausencia de antibióticos, la homeostasis epitelial se mantiene. Moléculas asociadas a microorganismos (MAMPs) son reconocidas por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) intracelulares y extracelulares con la posterior secreción de péptidos antimicrobianos. (b) El tratamiento con antibióticos altera la homeostasis intestinal donde grupos de la microbiota normal son eliminados por lo que se reduce la producción de MAMPs y por consiguiente, una menor señalización por parte de los PRRs. Como consecuencia de esto, se altera la barrera epitelial lo que facilita la invasión de patógenos entéricos. **Willing et al (2011)**

La [figura 16](#) 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 MAMPs 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 MAMPs 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.

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 filamentosas *Streptomyces* como son la estreptomicina, la eritromicina, la tetraciclina y la vancomicina.

Desde entonces, la investigación ha seguido dos caminos diferentes: modificación de moléculas a partir de los núcleos esenciales de los antibióticos originales y la síntesis de nuevas moléculas, eficaces contra los patógenos.

Mediante el primer proceso, la síntesis química introduce numerosas variaciones en las moléculas, las cuales consiguen modificar el espectro antibacteriano del antibiótico original de una manera sustancial. 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 β -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. A finales de 1999, solo los fluoroquinolones (por ejemplo, la ciprofloxacina) constituyen una clase significativa de antibióticos que son totalmente sintéticos.

Con el segundo proceso se obtiene la producción de moléculas que muestran una eficacia específica, como es el caso de la isoniazida y del etambutol frente a las microbacterias (género de bacterias causante de enfermedades como la tuberculosis); diversos imidazólicos frente a hongos, etc

En la [figura 17](#) se ilustra la evolución seguida en las cefalosporinas, desde los antibióticos naturales hasta las modificaciones químicas introducidas en las sucesivas generaciones de cefalosporinas.

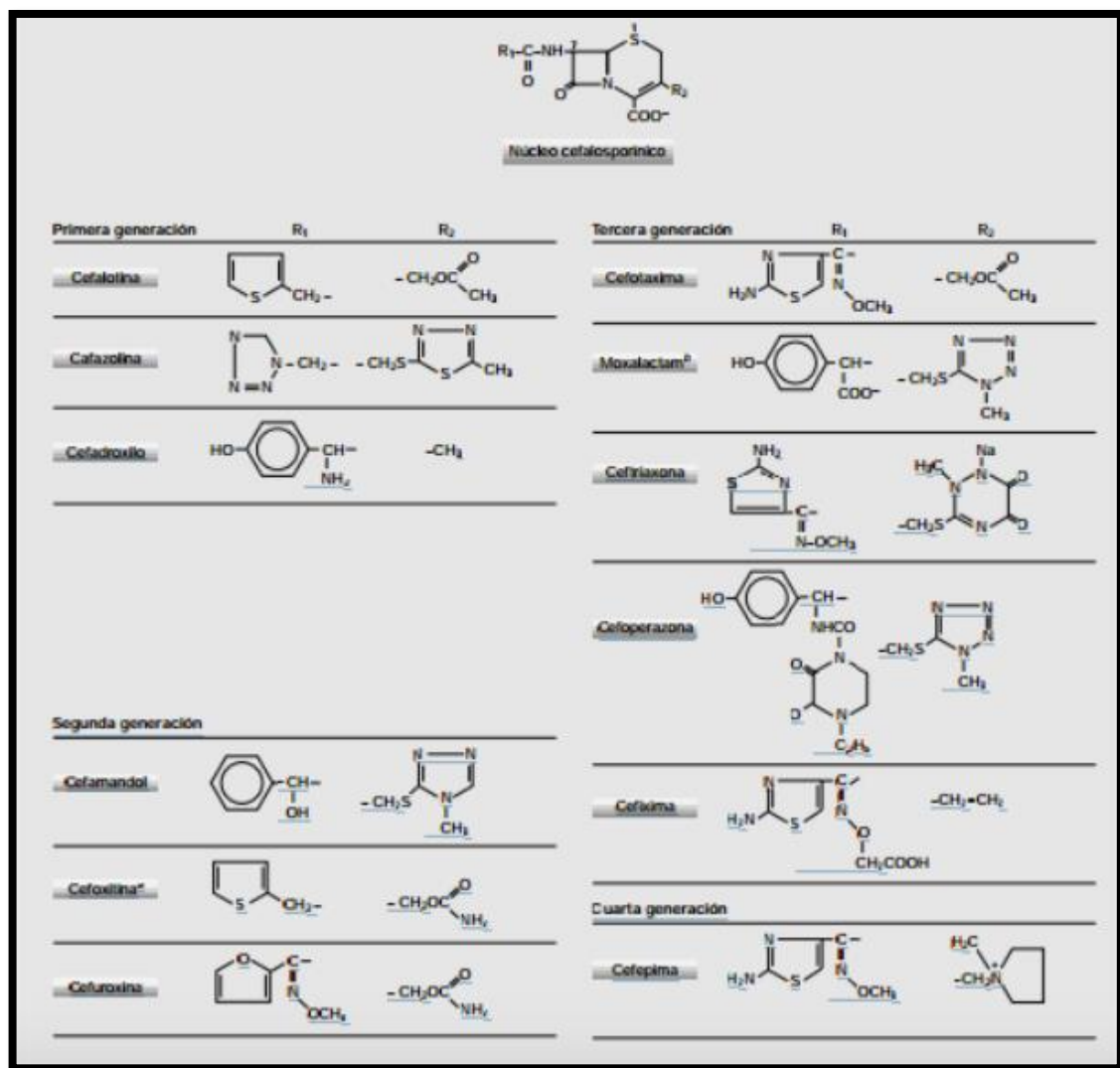


Figura 17. Estructura general de las cefalosporinas. Las cefalosporinas junto con las penicilinas pertenecen al grupo de antibióticos β -lactámicos que tienen como característica común un anillo de β -lactámico. Se trata del grupo de antibióticos más amplio y de mayor importancia en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Las cefalosporinas se han ido modificando con distintas cadenas laterales (añadidas a la molécula de ácido 7-aminocefalosporánico) dando lugar a tres generaciones bien diferenciadas y una cuarta que se está iniciando en la actualidad. Florez, Jesús. (1998) *Farmacología humana* (3ª ed. edición). Masson. p. 1062

5.3. Blancos para las principales clases de drogas antibacterianas.

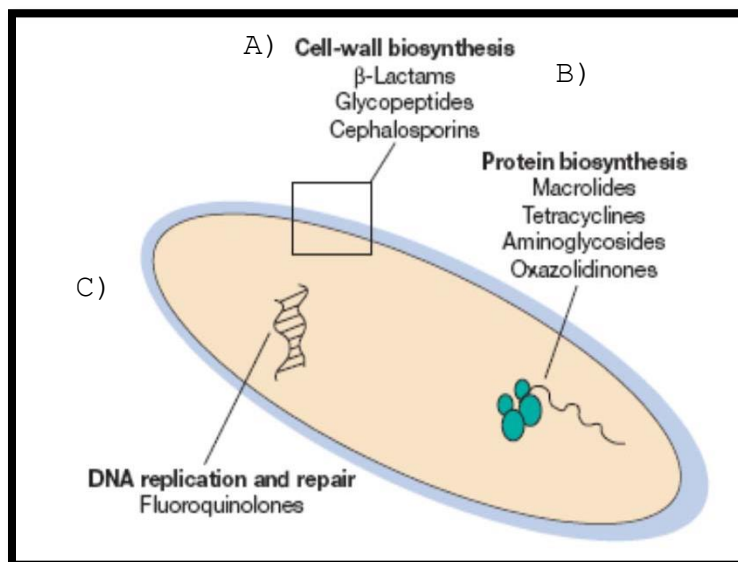


Figura 18. Blancos de acción para las principales clases de antibióticos. **A)** Inhibición de la síntesis de la pared celular, en fases diversas de la síntesis: β-lactámicos, fosfomicina; **B)** Inhibición de la síntesis de proteínas, por actuar sobre ribosomas; en la iniciación (subunidad 30): tetraciclinas; en la elongación (subunidad 50): cloranfenicol; en ambas subunidades: aminoglucósidos; **C)** Interferencia en la reparación y replicación del DNA: fluoroquinonas.

5.3.1. Biosíntesis de la pared celular.

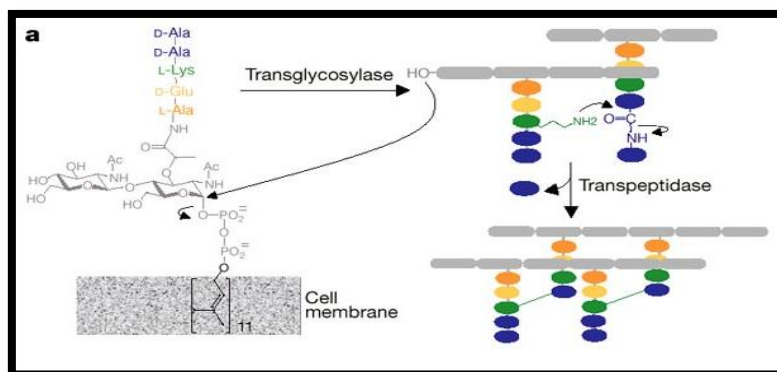


Figura 19. El peptidoglicano es el principal componente de la pared celular rígida que protege a las bacterias de la lisis osmótica. Está formado por polisacáridos y péptidos entrelazados mediante diversos pasos que incluye una reacción a cargo de una transpeptidasa. Walsh (2000)

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. 19). 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.

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- β -1,4-N-acetilmuramil-pentapeptido-pirofosforil-undecaprenol (lípidio 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 β -lactamo, que actúan como pseudosubstratos acetilando los sitios activos de las transpeptidasas (también llamadas proteínas de unión a penicilina o PBPs (Fig. 20). 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

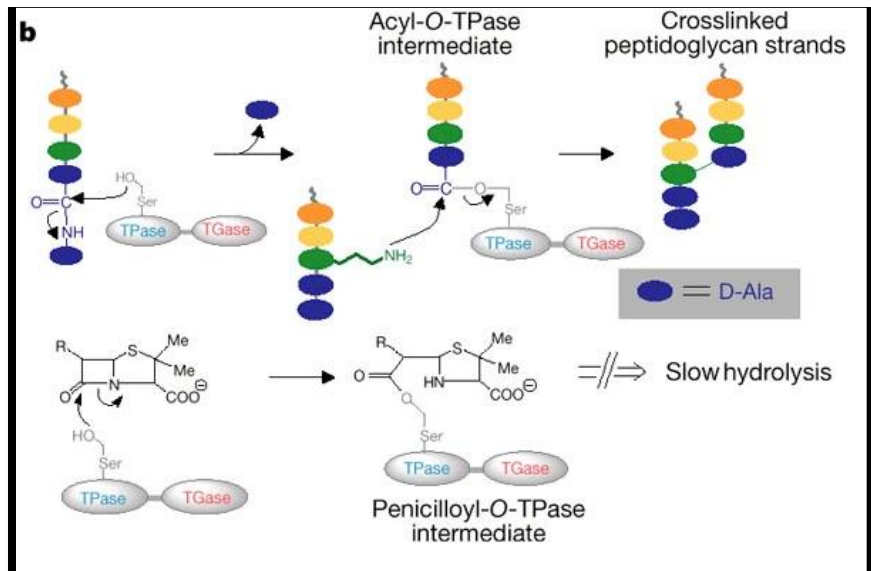


Figura 20. Inhibición de la actividad transpeptidasa por actividad de la penicilina. El ataque sobre la parte amida del anillo β -lactámico por una Ser del sitio activo da lugar a un producto acil-enzima. Este se hidroliza tan lentamente que la transpeptidasa permanece inactivada. Walsh (2000)

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. 21).

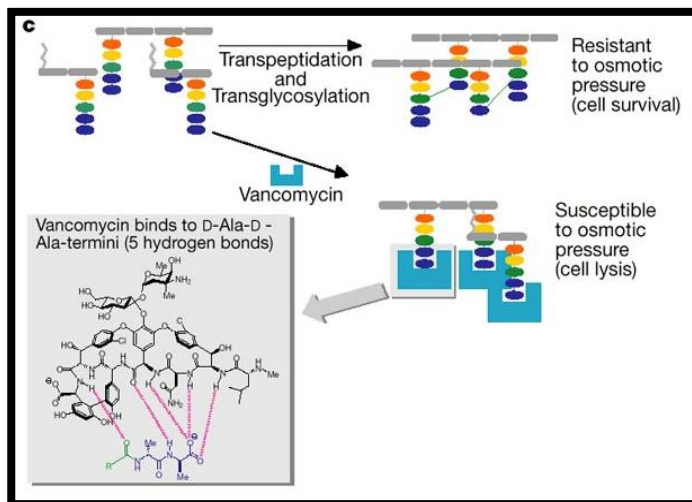


Figura 21. Formación de un complejo entre los extremos de D-Ala-D-Ala del peptidoglicano con la vancomicina, estabilizado por una red de cinco puentes de hidrógeno. Walsh (2000)

Dado que los β -lactamos y la vancomicina actúan en etapas adyacentes –substrato y enzima– actúan sinérgicamente cuando se emplean en combinación.

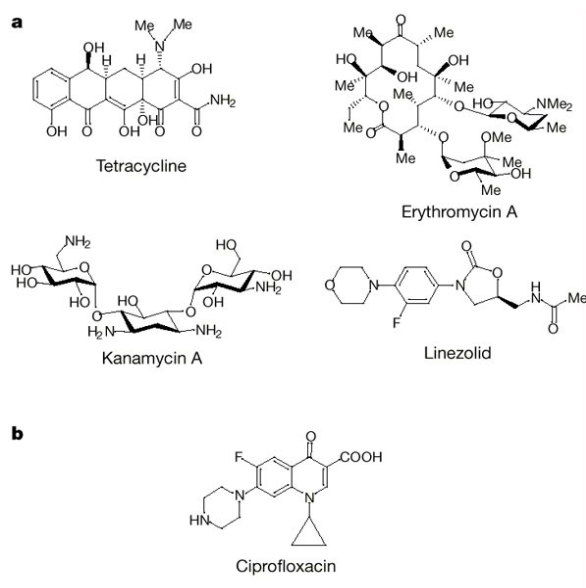
5.3.2. Síntesis de proteínas.

Los RNAs y proteínas de los ribosomas procarióticos son lo suficientemente distintos de los eucarióticos, lo que hace que existan muchos inhibidores específicos de la síntesis de proteínas con actividad antibacteriana selectiva (Fig 22).

Entre éstos se encuentran:

- Los **macrólidos** de la clase de las eritromicinas: inhiben la actividad de la peptidil transferasa, interfiriendo con la translocación de los aminoácidos durante la traducción y ensamblaje de las proteínas
- Las **tetraciclinas** (que son productos de vías biosintéticas de policetidos aromáticos): provocan la inhibición de la síntesis proteica en el ribosoma al unirse a la subunidad 30S del ribosoma y no permiten la unión del ácido ribonucleico de transferencia (**tRNA**).
- Los **aminoglicósidos** (de los que la estreptomicina fue el miembro fundador y que ahora ha sido suplantado por variantes sintéticas como la kanamicina). Por ejemplo, la estreptomicina se une de manera específica a la subunidad 30S del ribosoma; el resto de aminoglucósidos se unen también a los ribosomas inhibiendo la síntesis de proteínas pero lo hacen en sitios de unión diferentes respecto la estreptomicina, por los que no compiten con esta última y al parecer, se unen a ambas subunidades ribosómicas 30S y 50S.
- Grupo de las **oxazolidinonas** (linezolid). Inhiben la síntesis proteica en una diana distinta respecto los otros microbicidas: se unen a la subunidad 50S, inhibiendo la formación del complejo de iniciación 70S.

Figura 22. Estructura química de los algunos antibióticos (a) Inhibidores de la síntesis de proteínas en bacterias.entre los que encontramos una variedad de estructura, representado por la eritromicina, clase de macrólidos; tetraciclina; aminoglicósidos (representado por la kanamicina) (b) Fluoroquinonas, representado por la ciprofloxacina, inhibidor de la ADN girasa. **Walsh** (2000)



5.3.3. Replicación y reparación del DNA.

Los fluoroquinolones, tales como la ciprofloxacina (de las familias de las quinilonas) ([Fig. 23](#)), matan las bacterias a través de inactivar el enzima DNA girasa, el enzima responsable de desenrollar los círculos enrollados de DNA bacteriano de doble cadena que se obtienen después de cada ronda de replicación de DNA. Las DNA girasas son topoisomerasas tipo II compuesta por cuatro subunidades (dos subunidades A y dos B). 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)₂(GyrB)₂. Posteriormente, las hebras se religan una vez que se ha aliviado el superrenrollamiento. Las moléculas de la DNA girasa se desplazan a lo largo del DNA por delante de la horquilla de replicación y eliminan los superenrollamientos positivos. Se trata de un proceso que se lleva a cabo por liberación de energía durante la hidrolisis de ATP.

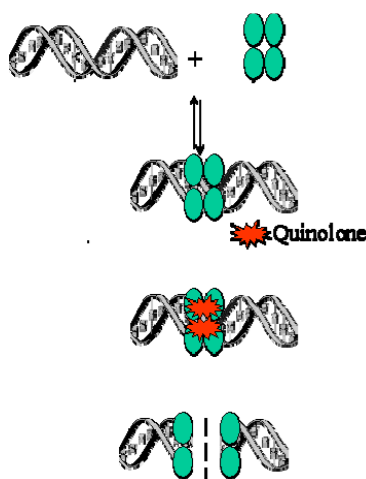


Figura 23. Mecanismo de acción de las quinilonas.

La ciprofloxacina forma un complejo con el enzima (uniéndose a través de la subunidad A) 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 dado que el ADN no puede mantener su topología habitual.

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

Se dice que una vez que un antibiótico se ha mostrado 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 40.

La resistencia a antibióticos 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.

Esta transmisión génica horizontal se lleva a cabo a través de elementos extracromosomales tales como transposones, plásmidos e integrones de bacteriófagos. (Fig. 24)

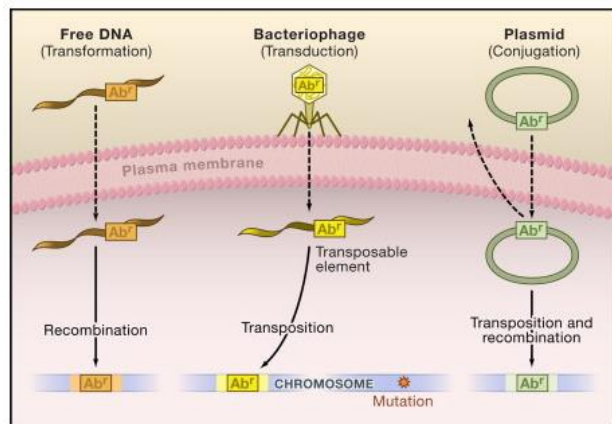


Figura 24. Adquisición de resistencia a antibióticos. Las bacterias pueden adquirir resistencia a antibióticos (Ab') por mutaciones en los genes cromosomales. Pueden adquirir material genético foráneo incorporando segmentos de DNA en su cromosoma (transformación), por la infección de un bacteriófago (transducción) o por la incorporación de transposones o plásmidos durante la conjugación. (Alekhshun, Levy, S.B. (2007))

Aunque la transferencia de genes ocurre frecuentemente entre organismos del mismo género, este proceso también se ha visto entre diferentes géneros de bacterias, incluyendo transferencia entre organismos distantes evolutivamente como bacterias gram positivas y gram negativas.

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 107, hacen que, por ejemplo, en un conjunto de 1010 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.

El tratamiento con un antibiótico debe reducir al máximo la probabilidad de selección de bacterias mutantes resistentes, lo cual ocurre con más facilidad a dosis subterapéuticas. Para ello es necesario a) administrarse de forma temprana para impedir el aumento del inóculo y la formación de biofilms, b) alcanzar concentraciones de antibiótico en el foco de infección por encima de la concentración preventiva de aparición de mutantes y c) evitar y limitar el tiempo en el que la concentración del antibiótico en el lugar de la infección se encuentra dentro de la ventana de selección de mutantes, para disminuir la selección de poblaciones resistentes.

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.

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.

Lo que ocurre es que 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.

El eflujo del antibiótico originalmente fue descrito para tetraciclinas, aunque ahora se contempla de forma común en las bacterias. La mayoría de proteínas implicadas en el eflujo del antibiótico pertenecen a 5 familias de proteínas: RND (resistance-nodulation-cell division), MF (major facilitator), SMR (staphylococcal/small multidrug resistance), ABC (ATP-binding-cassette) y MATE (multidrug and toxic compound extrusión).

El eflujo por proteínas de las familias RND, SMR, MF y MATE está dirigido por un transporte secundario, dirigido por un gradiente de protones o de sodio (Fig. 25).

El eflujo por proteínas de transportadores primarios de tipo ABC está dirigido por la hidrólisis del ATP (Fig. 25).

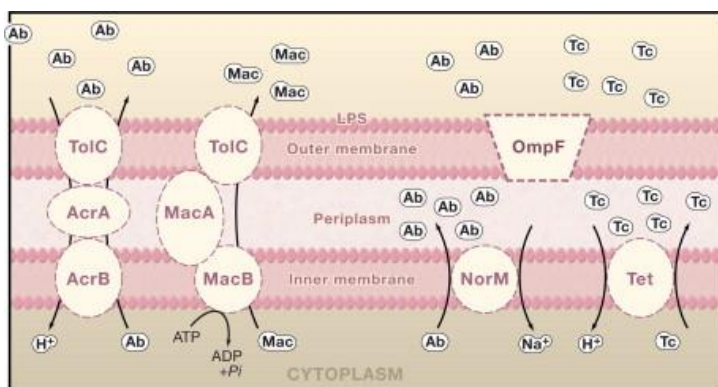


Figura 25. Sistemas de eflujo de antibióticos. Para simplificar se representa una bacteria gram-negativa. El sistema de *E. coli* AcrAB-TolC y el sistema de eflujo de tetraciclina (Tet) son sistemas de transporte activo secundario acoplado a la entrada de protones, mientras que el sistema NorM de *Vbrio ssp* utiliza el gradiente de sodio para el eflujo del antibiótico. Otro sistema es el de MacAB-TolC, que utiliza la hidrólisis del ATP para expulsar el antibiótico. Los dos sistemas de la izquierda expulsan directamente el antibiótico al exterior celular mientras que los dos de la derecha lo expulsan al periplasma, donde por el sistema OmpF se expulsa al exterior celular. **Alekshun & Levy, (2007).**

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.

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, en bacterias gram negativas, es selectiva para antibióticos de la familia de las tetraciclinas. La expresión del gen tetA es regulado de forma negativa por TetR, un regulador que es sensible a tetraciclina.

Otro ejemplo es la bomba de eflujo TetK-TetL para expulsar tetraciclina en bacterias gram positivas, donde la síntesis de esas bombas es inducida por tetraciclina, por un mecanismo de atenuación de la traducción y reiniciación.

Las 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.

5.4.2. Destrucción del antibiótico.

El ejemplo clásico es la desactivación por hidrólisis del anillo β -lactamo (Fig. 26) en las penicilinas y cefalosporinas a través de la elaboración del enzima β -lactamasa por la bacteria resistente. Las β -lactamasas pueden clasificarse en base a su función (sistema de Bush-Jacoby-Medeiros), su estructura (sistema de Ambler) o en base a si tienen una serina en el centro activo y de si dependen de un cofactor metálico. Se localizan en plásmidos y transposones, aunque también se encuentran en el cromosoma, aportando resistencia intrínseca.

Dado que es el anillo lactámico la parte funcional, su rotura rinde un producto inactivo que no interacciona con las PBPs. Las bacterias que producen lactamasa secretan la enzima al periplasma para destruir los antibióticos β -lactamos antes de que puedan alcanzar sus blancos (PBPs) en la membrana citoplasmática. Una sola molécula de β -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.

Otros 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 $-PO_3^-$, o acetil-transferasas, que acetilan los grupos amino de los antibióticos (Fig. 26).

Muchas de estas enzimas se encuentran en integrones y otros elementos móviles donde se asocian con otros determinantes de resistencia. Por ejemplo, tres genes que codifican para acetiltransferasas se encontraron en un integrón de clase 1 de *P. aeruginosa* que también tiene genes de resistencia a carbapenemos y sulfonamidas.

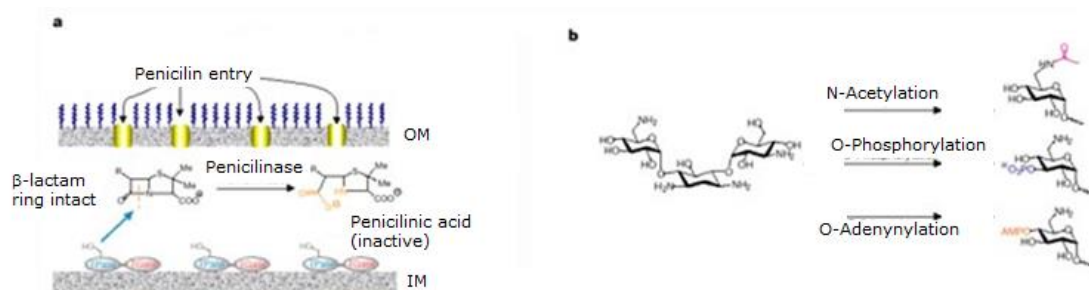


Figura 26. Destrucción de antibióticos. A) Efecto de β -lactamasa (penicilinasa) sobre el anillo β -lactamo (de penicilina) B) Efecto de acetil-transferasas, fosforil-transferasas y adenil-transferasas sobre el antibiótico aminoglicósido Walsh (2000)

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 auto-inmunidad o autodefensa.

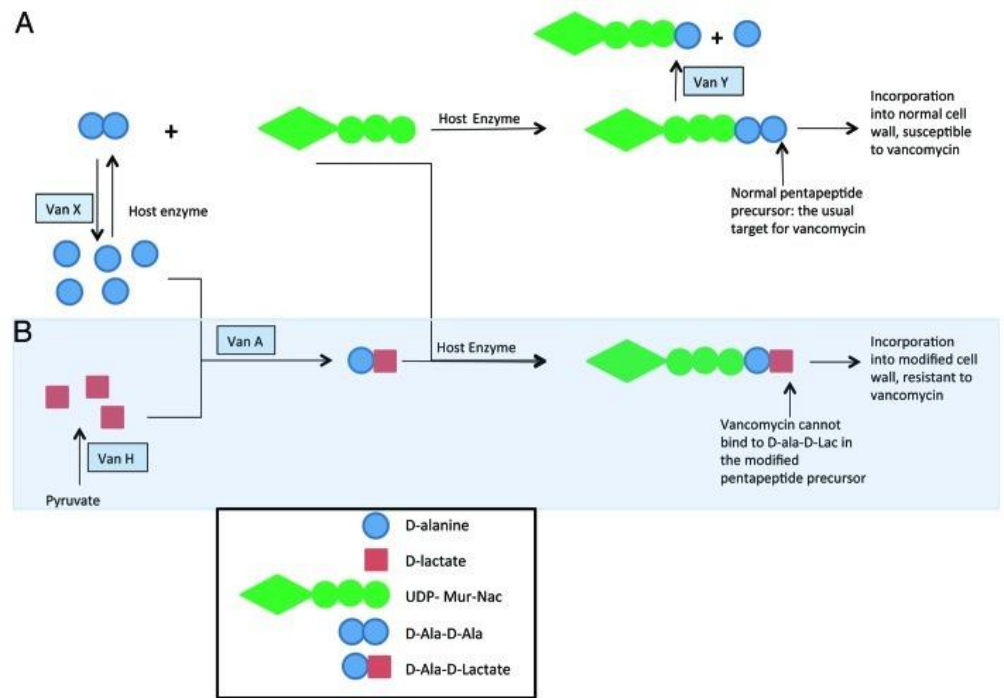
La presencia de genes *erm* generalmente confiere un fenotipo de resistencia denominado MLSB (resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B) y este fenotipo puede ser de expresión constitutiva o inducible (cMLSB o iMLSB). En las cepas con fenotipo iMLSB, la eritromicina induce la expresión del mecanismo de resistencia. Por ello, si se estudia la sensibilidad de estas cepas a eritromicina en ausencia de la misma, se manifestarán como sensibles a estos antibióticos, pero deben caracterizarse como resistentes, ya que poseen el mecanismo de resistencia que se puede inducir in vivo.

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. 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 implica a un sistema regulador con dos componentes, VanR y VanS, y tres enzimas VanH, VanA y VanX ([Fig. 27](#)). El sistema regulador “siente” la presencia de vancomicina y activa la expresión de los genes VanH, VanA y VanX. VanH es una α -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. Finalmente, VanX es una dipeptidasa dependiente de Zn^{2+} , altamente específica, que destruye la reserva celular de D-Ala-D-Ala ([Fig. 27](#)).

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. 27](#)). 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 acil-D-Ala-D-Lactato y la vancomicina.

Figura 27. Mecanismo de Resistencia a vancomicina. A) Van X capta D-Ala-D-Ala y lo destruye, eliminando el reservorio. Van Y actúa sobre el peptidoglicano normal, que es la diana de vancomicina y lo rompe formando el peptidoglicano con una D-Alanina menos. B) Van H utiliza el piruvato para generar D-Lactato. Van A forma el dipéptido D-Alanina-D-Lactato, y lo une a la parte glicana formando un peptidoglicano que no es reconocido por vancomicina. (Hollenbeck, et al.2012)



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.

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

S. aureus es uno de los microorganismos que utiliza este sistema de resistencia a penicilina. Por ejemplo, la adquisición de la proteína PBP2 conduce a la resistencia a penicilina, pues no es sensible a la inhibición por el anillo β -lactamo. PBP2 fue adquirida por *S. aureus* por la captación de un elemento móvil compuesto por un cassette de genes denominado SCCmec (staphylococcal-cassette-chromosome), y codifica para proteínas implicadas en recombinación específica de sitio.

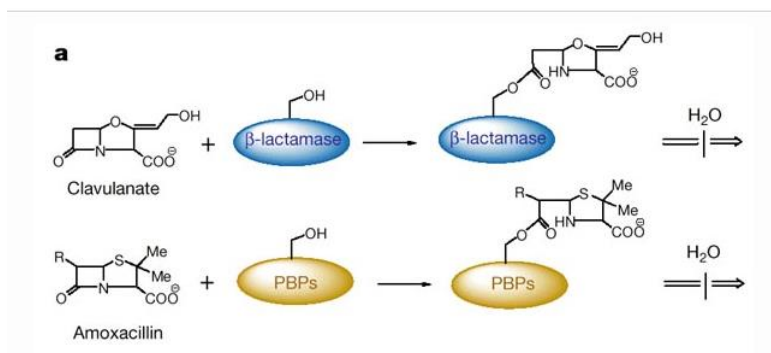
5.5. Desarrollo de nuevas drogas que eviten la resistencia.

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 β -lactamo apareció, los médicos jugaron con la periferia del anillo β -lactamo para obtener variantes que fueran efectivas.

Cuando las cepas productoras de β -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, 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 β -lactamo) tener un mayor rango antibacteriano. La

combinación de clavulanato y amoxicilina se llama augmentine (Fig. 28) y constituye una terapia de primera línea.

Figura 28. Augmentine, combinación de clavulanato y amoxicilina El clavulanato se une de forma irreversible a las β -lactamasas (sustrato suicida), permitiendo a la amoxicilina (con un anillo β -lactamo) inhibir a las PBPs (Walsh (2000))



Existen otras combinaciones de inhibidores de β -lactamasas y antibiótico β -lactamo también ampliamente utilizadas: Unasyn, Timentin y Zocin.

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. Se han diseñado eritromicinas de tercera generación, que además de ser menos susceptibles a las bombas de eflujo, es menos propensa a inducir la resistencia por metilación con Erm (Fig. 29).

b



Figura 29. Macrólidos de tercera generación (3-ketoclaritromicina) Se ha añadido un grupo ceto a la claritromicina, derivado de eritromicina, de forma que altera la conformación de la macrolactona y altera la susceptibilidad al eflujo y a los mecanismos de metilación. (Walsh (2000))

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 es 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. Por tanto, se piensa que las proteínas de resistencia han evolucionado a partir de precursores ancestrales que tenían poca o nula afinidad por los antibióticos (Fig. 30).

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 (Fig. 30). 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.

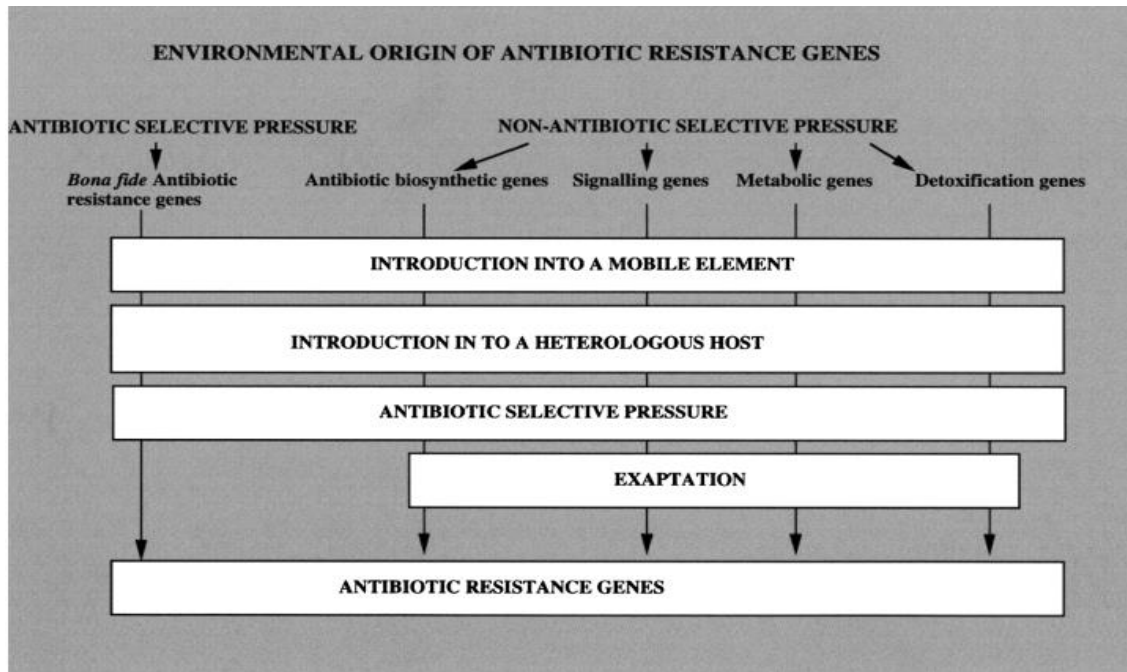


Figura 30. Origen de los genes de resistencia a antibióticos. Los genes de resistencia a antibióticos se pueden encontrar tanto en microorganismos productores de antibióticos como no productores. Algunos de estos genes de resistencia parten de bacterias productoras de antibióticos, para proteger a la misma. Otros genes pudieron estar implicados en otros procesos celulares como biosíntesis de antibióticos, señalización, metabolismo o detoxificación y fueron seleccionados en el organismo original para realizar esas funciones en ausencia de antibióticos. Sin embargo, una vez se introducen en un hospedador heterólogo y es seleccionado en presencia de antibióticos, estos genes se transforman en genes de resistencia a antibióticos. **Alonso, et al. (2001).**

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.

6. 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 llevado 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 (Fig. 31)

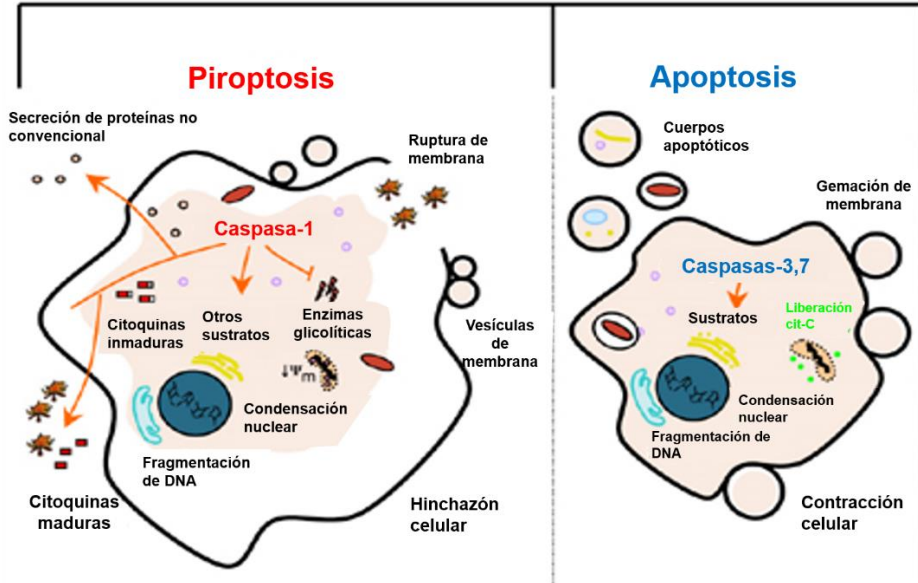


Figura 31. Diferencias entre piroptosis y apoptosis. Las células apoptóticas o piroptóticas desencadenarán cambios morfológicos y bioquímicos diferentes, otros serán compartidos. Al contrario que la piroptosis, la apoptosis no produce inflamación. Otra diferencia entre ambas es que en el proceso de piroptosis los patógenos citoplásmicos son detectados por inflamasomas dependientes de caspasa-1, mientras que en apoptosis los patógenos se rodean de autofagosomas que se fusionan con lisosomas para su degradación. Además, durante el proceso apoptótico no se produce la ruptura de la membrana, algo que en piroptosis sí ocurre, sino que se generan cuerpos apoptóticos que serán posteriormente fagocitados. (Adaptada de Labbé & Saleh (2009)).

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, como, 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 β (IL-1 β) 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. 32). En cambio, esta caspasa no está implicada en apoptosis. La activación de la caspasa-1, que va a ser inducida por diferentes estímulos, conduce a una rápida formación de poros, de un diámetro de 1.1-2.4nm, 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.

Simultáneamente, los precursores de IL-1 β e IL-18 son procesados por la caspasa-1 y liberados durante la piroptosis a través de diversas vías (Fig. 32):

- i) a través de los poros
- ii) liberación de microvesículas
- iii) exocitosis de lisosomas, que se fusionan con la membrana plasmática y liberan los precursores al medio externo.

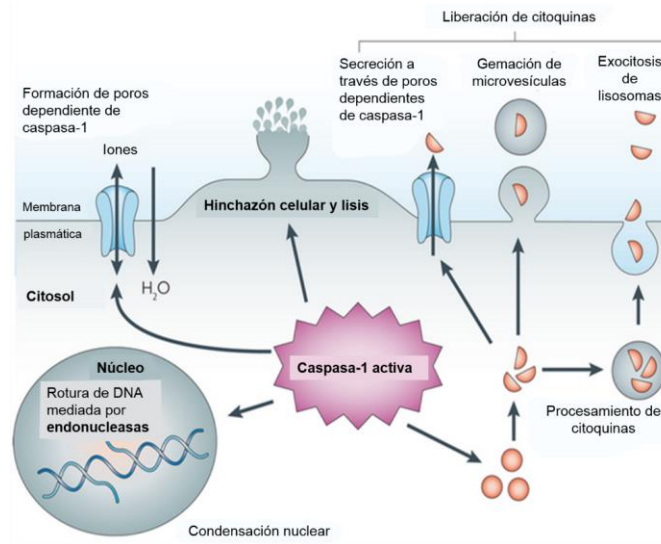


Figura 32. Piroptosis, una respuesta inflamatoria del huésped. Caspasa-1 es cortada y activada en respuesta a múltiples estímulos, lo que resulta en un programa conservado de muerte celular llamado piroptosis. La activación de la caspasa-1 lleva a la formación rápida de poros en la membrana plasmática que disipan los gradientes iónicos celulares permitiendo la entrada de agua, el hinchamiento de la célula y la lisis osmótica. Los precursores de IL-1 β e IL-18 son procesados por caspasa-1 y liberados durante la piroptosis. La secreción no requiere lisis y está asociada temporalmente con la formación de poros dependiente de caspasa-1. Otros mecanismos de secreción incluyen la exocitosis de lisosomas independiente de caspasa-1 y la expulsión de microvesículas. La actividad de caspasa-1 resulta en la rotura del DNA cromosómico que no produce los fragmentos oligonucleosomales observados durante la apoptosis. (Adaptada de Bergsbaken et al (2009))

La caspasa-1 también promueve la rotura del DNA cromosomal, aunque no resulta la generación de fragmentos oligonucleosomales como ocurre durante la apoptosis, sino que se trata de una rotura desorganizada, que es llevada a cabo por una endonucleasa aún sin identificar. En la piroptosis tampoco se observa condensación del núcleo, ni su fragmentación como ocurre durante la apoptosis. Finalmente, la célula se destruye, generando una respuesta inmunitaria para eliminar a los patógenos causantes de la misma.

Entre los factores celulares que activan la caspasa-1 se encuentran las proteínas NLR (“Nod-like receptors”), moléculas especializadas en detectar patógenos virales y bacterianos y otras señales de peligro en el citoplasma celular. La interacción con sus ligandos (moléculas bacterianas, virales e incluso del propio organismo) va a conducir a la activación de la caspasa-1 (Fig. 33).

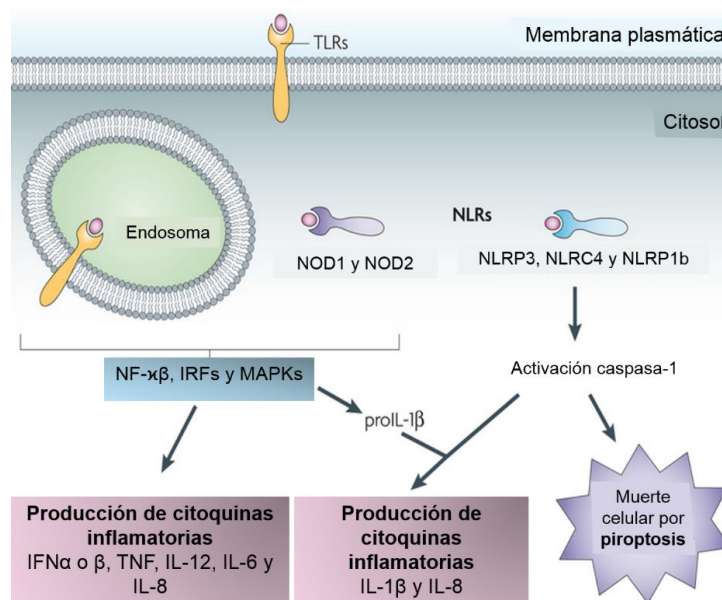


Figura 33. La detección de señales de peligro derivadas del huésped y del microorganismo lleva a dos respuestas distintas: activación de la célula o muerte celular. Los dominios ricos en leucina (LRR) median el reconocimiento por parte del huésped de patrones moleculares asociados a patógenos o señales de peligro. Los receptores TLR (Toll-like receptors) son proteínas transmembrana que contienen dominios LRR que detectan señales de peligro localizados en el medio extracelular y dentro de endosomas. Los TLRs inician una cascada de señalización que lleva a la activación de la célula a través del factor nuclear- κ B (NF- κ B), la kinasa MAPK y factores regulados por interferón (IRF) y una producción de citoquinas inflamatorias (incluyendo IFN α , IFN β , TNF, IL-12, IL-6, IL-8 y pro-IL-1 β). Nod-like receptors (NLRs) funcionan en el reconocimiento de las señales de peligro introducidas en el citosol de la célula huésped. Al igual que TLRs, la estimulación de NOD1 y NOD2 resulta en una producción de citoquinas. Otro conjunto de NLRs median la activación de la caspasa-1, que desencadena la muerte celular dependiente de esta (piroptosis) y procesamiento y liberación de citoquinas inflamatorias IL-18 e IL-1 β . (Adaptada de Bergsbaken et al (2009))

En el genoma humano están codificadas 23 proteínas de la familia NLR y 34 en el genoma de ratón. En la [figura 34](#) se ilustran algunos ejemplos de moléculas NLR y de las señales que las activan.

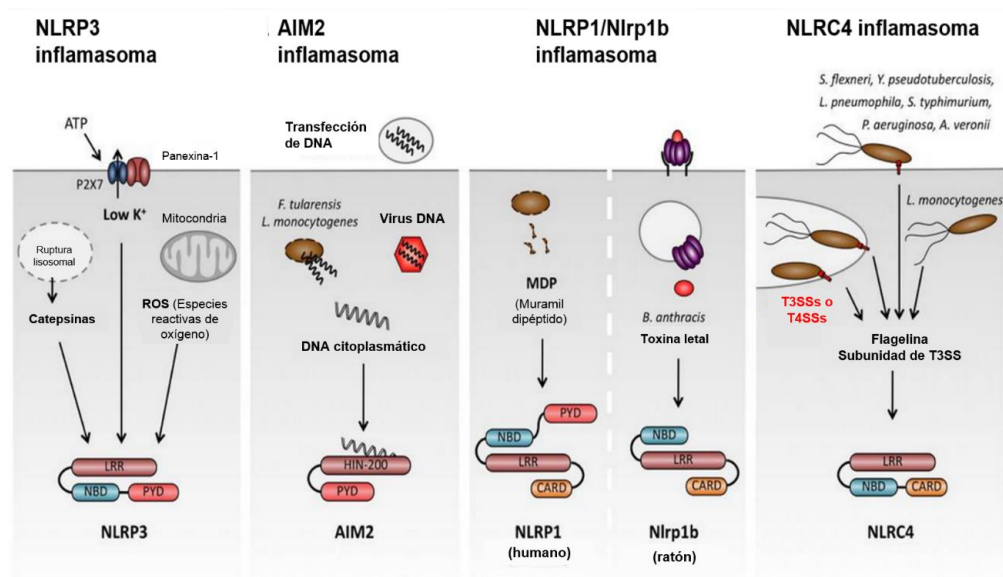


Figura 34. Los receptores del inflammasoma reconocen una variedad de patógenos microbianos y señales de peligro. NLRP3 responde a numerosos estímulos. Las señales terminales comunes parecen ser la ruptura lisosomal y la liberación de catepsinas, la liberación de potasio y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). AIM2 funciona como un sensor de DNA citosólico, detectando el DNA introducido por transfección, infección con la bacteria citosólica patógena *Francisella tularensis* o *Legionella monocytogenes* o virus DNA. La NLRP1 humana responde al muramyl-dipéptido, mientras que la toxina letal de ántrax tiene como diana la Nlrp1b de ratón. La NLRC4 detecta en el citosol a la flagelina o la subunidad de la varilla del T3SS. LRR: repeticiones ricas en leucina; NBD: dominio de unión a nucleótidos y de oligomerización; PYD: dominio similar a "Pyrin"; CARD: dominio de reclutamiento y activación de caspasas. (Adaptada de Broz & Monack (2011))

La primera proteína de esta familia en ser descrita fue NLRP1. En ratón (denominada Nlrp1b), se ha visto que es responsable de sensibilidad de los macrófagos a la toxina letal (LeTx) de *Bacillus anthracis*, solo se observa activación de la caspasa-1 en cepas susceptibles. En humanos, la proteína NLRP1 resulta activada por muramyl 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 como DNA viral, RNA y otras moléculas de patógenos. Pero además, se activa en respuesta a concentraciones elevadas de ATP, irradiación ultravioleta, cristales de ácido úrico, asbestos, sílice y agregados β -amiloideos. 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. La liberación de catepsinas a partir de lisosomas dañados, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, "reactive oxygen species") y la liberación de potasio han sido postuladas como estas señales comunes. No obstante, el mecanismo por el que NLRP3 detecta este grupo tan diverso de señales no se conoce.

Otra proteína NLR, NLRC4, media el reconocimiento de productos derivados de patógenos intracelulares (por ejemplo, *Salmonella*, *Listeria*, *Legionella* y *Shigella*). Uno de los productos bacterianos activadores de NLRC4 es la flagelina, aunque existen otros, peor caracterizados.

Recientemente se ha identificado a la proteína AIM2 ("absent in melanoma 2") como una molécula capaz de inducir el ensamblaje del inflammasoma y la subsiguiente activación de la caspasa-1 en respuesta a DNA de cadena doble (dsDNA) presente en el citoplasma. AIM2 es el primer ejemplo de una proteína, no perteneciente a la familia NLR, que es capaz de activar esta respuesta.

Una vez que se produce el reconocimiento de las señales derivadas de microorganismos (o también del propio organismo), las NLRs disparan la formación de un complejo multiproteico denominado inflammasoma, que contiene la caspasa-1 (Fig. 35).

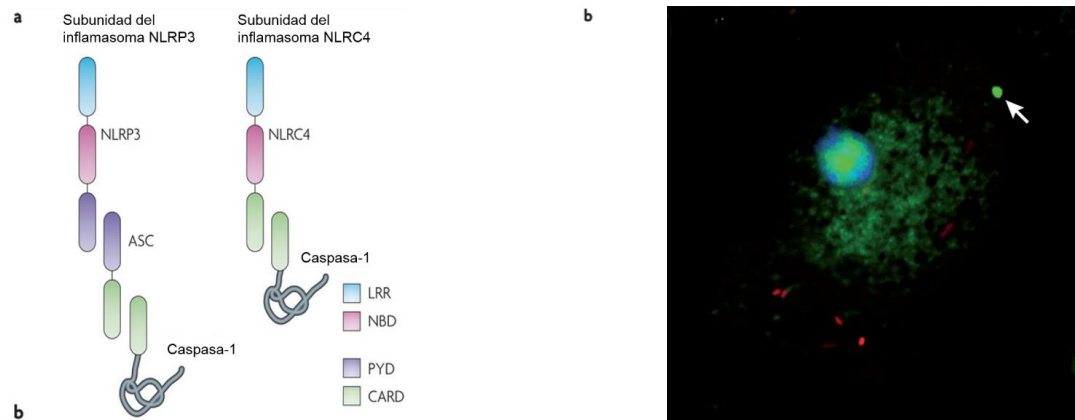


Figura 35. Componentes del inflammasoma y visualización del complejo del inflammasoma. a | Los dominios ricos en leucina (LRR) de los receptores NLR (Nod-like receptor) están implicados en la detección de un rango de señales de peligro intracelulares. Tras el reconocimiento de ligando, el dominio de unión a nucleótidos y oligomerización (NBD) media una asociación de NLRs. Algunos NLRs como NLRP3 contienen un dominio “Pyrin” (PYD) que interacciona con la proteína adaptadora ASC. Esta contiene un dominio de activación y reclutamiento de caspasas (CARD) que se une y facilita la activación de caspasa-1. Otros NLRs como NLRC4 contienen un dominio CARD e interaccionan directamente con caspasa 1. Sin embargo, ASC es a menudo requerida para la activación de la caspasa 1 dependiente de NLRC4, indicando que ASC puede participar en la formación del inflammasoma NLRC4 o desempeñar un papel adicional en la activación de la caspasa-1. **b** | La infección por *Salmonella* (rojo) de macrófagos resulta en una activación de la caspasa-1 (verde), lo cual se visualiza utilizando un inhibidor fluorescente de la enzima activa. La forma activa de la caspasa-1 se encuentra a menudo concentrada dentro de un foco único (indicado con la flecha) y difusamente distribuido por el citoplasma. (Adaptada de Bergsbaken et al (2009)).

Las citoquinas inflamatorias IL-1 β e IL-18, que son activadas por la caspasa-1 y liberadas durante la piroptosis, van a tener diversos efectos sobre el sistema inmunitario. IL-1 β 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- γ 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.

Dado el papel que la piroptosis tiene en el control de las infecciones microbianas, no es sorprendente que los patógenos hayan adquirido 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. 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.

7. 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 los metales esenciales, proceso denominado inmunidad nutricional.

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.

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, 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 otras anemias crónicas, que requieren transfusiones frecuentes, tienen una mayor incidencia de infecciones, debido a una mayor hemólisis y liberación de hemoglobina.

En la [figura 36](#) se muestran los mecanismos dispuestos por el hospedador para limitar el acceso al Fe de los microorganismos invasores. En los vertebrados, la mayoría del Fe se encuentra acomplejado con el hemo, un anillo tetrapirrólico que rodea a un átomo de Fe^{2+} . El hemo es el cofactor de la proteína transportadora de oxígeno, la hemoglobina. La hemoglobina se encuentra dentro de eritrocitos circulantes, lo que además representa una barrera de acceso al Fe para los patógenos. Si la hemoglobina o el hemo se liberan de los eritrocitos, estos van a ser unidos por la haptoglobina y la hemopexina, respectivamente. La haptoglobina va a formar complejos con la hemoglobina que serán retirados de la circulación a través del hígado y catabolizados por las células del parénquima hepático. Va a actuar mediante la formación de dímeros, de tal manera que cada dímero de haptoglobina será capaz de unirse a dos moléculas de hemoglobina. La hemopexina va a actuar de forma similar.

Además de encontrarse acomplejado 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 fagosome.

A pH fisiológico, el Fe^{2+} extracelular se oxida a 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. La transferrina va a favorecer la captación de Fe por parte de las células que tengan receptores para la transferrina. 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. Por otro lado, los hepatocitos son fundamentales para la homeostasis del hierro, ya que actúan como almacenes de hierro, y también son los encargados de producir la hormona hepcidina. Esta hormona se produce cuando los niveles circulantes de hierro son grandes y se suprime en situaciones de anemia o en momentos de eritropoiesis muy activa. La hormona favorece la captación del hierro por las células y disminuye la absorción intestinal.

El 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.

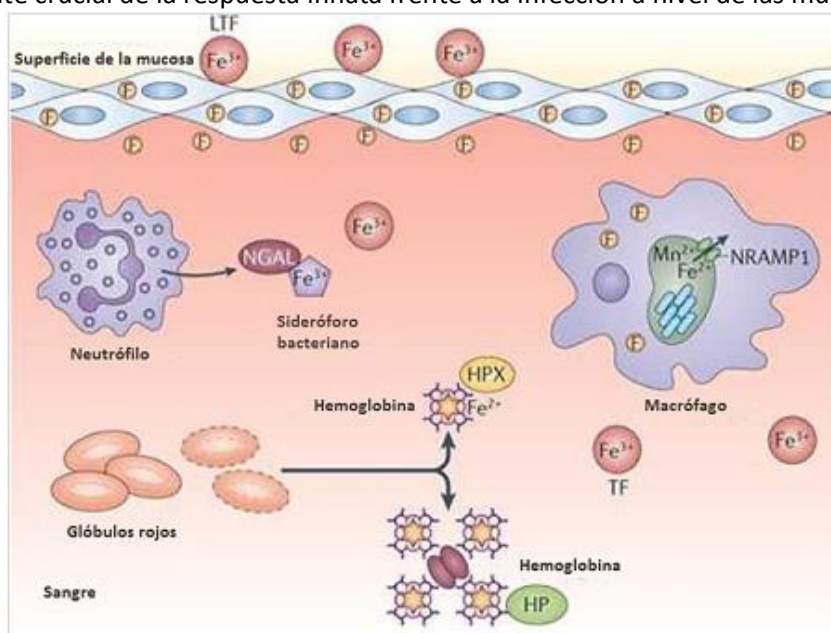


Figura 36. Limitación del Fe durante infecciones bacterianas. El Fe^{3+} es retenido en el interior celular formando complejos con ferritina (F), unido en el suero por transferrina (TF) o unido por la lactoferrina (LTF) en la superficie de las mucosas. En la sangre, el Fe^{2+} está acomplejado con el grupo hemo, que está unido a la hemoglobina en los eritrocitos. Cuando se produce hemólisis, la hemoglobina es unida por la haptoglobina (HP) y el grupo hemo libre es secuestrado por la hemopexina (HPX). Además, la NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) se une y secuestra a los sideróforos bacterianos que quelan el Fe^{3+} . La proteína NRAMP1 (natural resistance-associated macrophage protein 1) se localiza en la membrana de los fagosomas, donde actúa sacando el Fe^{2+} y el Mn^{2+} fuera del fagosoma, limitando la disponibilidad de estos metales para las bacterias. Modificada a partir de figura en Hood & Skaar (2012).

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 Fe^{2+} por Mn^{2+} en

muchas de sus enzimas, por lo que no requiere Fe^{2+} para infectar a su hospedador. Sin embargo, como se comenta más abajo, el hospedador también posee mecanismos para restringir la disponibilidad de Mn^{2+} .

Para la adquisición de Fe, los microorganismos comúnmente utilizan sideróforos y sistemas de adquisición de hemo o de Fe^{2+} libre (Fig. 37). Los sideróforos, moléculas de bajo peso molecular, son quelantes de Fe que son secretados por las bacterias y que unen 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 interaccionar 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 la membrana externa se va a encontrar el transportador dependiente de TonB, que va a introducir los sideróforos al periplasma usando la energía generada gracias a la fuerza protonmotriz de la membrana interna asociada a la actividad del complejo TonB-ExbB-ExbD. En el periplasma, las proteínas SBPs ("substrate-binding proteins") reconocen los complejos sideróforo- 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 Fe^{3+} unido a los sideróforos es liberado a través de una reducción a 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.

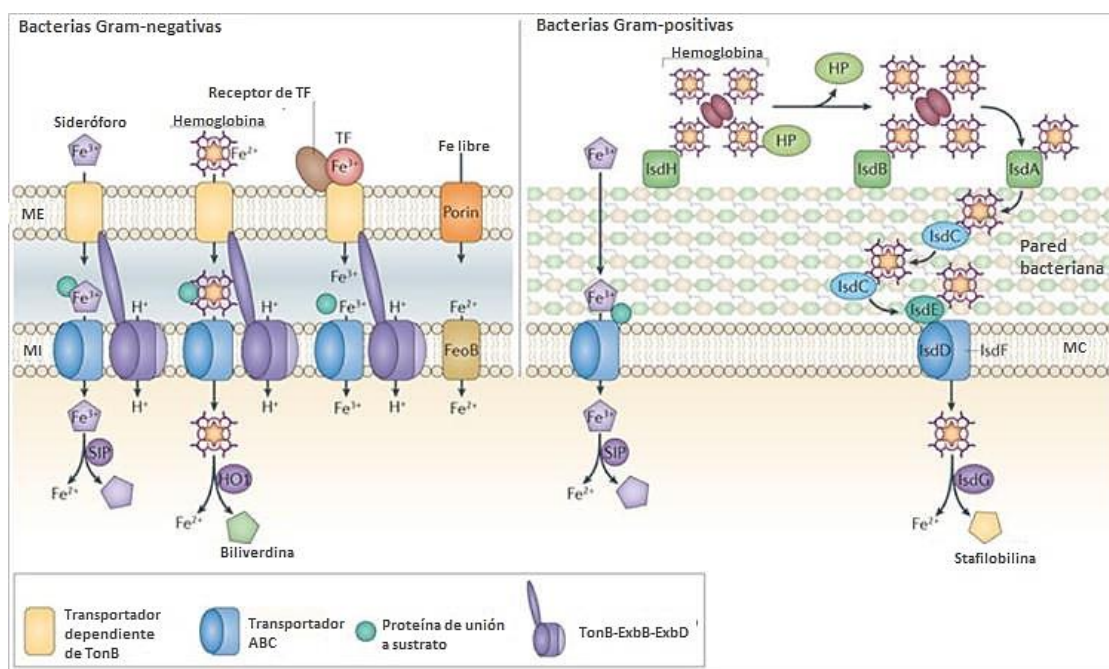


Figura 37. Adquisición del Fe durante infecciones bacterianas. Tanto las bacterias Gram positivas como Gram negativas poseen sistemas para adquirir Fe^{3+} a través de sideróforos o directamente a través del grupo hemo, de la transferrina o del Fe^{2+} libre. Todos estos sistemas no se encuentran en todos los organismos, pero otros, como por ejemplo las familias HO1 e IsdG de las hemoxigenasas, se han encontrado tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. TF, transferrina; ME, membrana externa; MI, membrana interna; MC, membrana celular; HP, haptoglobina; HO1, hemoxigenasa; Isd, determinante de superficie regulado por Fe; SIP, proteínas de interacción con sideróforos. Modificada a partir de figura en Hood & Skaar (2012).

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. 36).

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. 37). 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 (Fig. 37). Así, miembros de la familia HO1, presentes tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, degradan el grupo hemo a Fe^{2+} y biliverdina. También en ambos grupos de bacterias, las oxigenasas de la familia IsdG degradan el hemo generando Fe^{2+} y el cromóforo estafilobilina.

Además, algunas bacterias (*Neisseria*, *Haemophilus influenzae*) presentan receptores de transferrina; estos receptores extraen el Fe^{3+} de la transferrina y lo introducen en el citoplasma mediante el sistema TonB-ExbB-ExbD (Fig. 37). Algunas bacterias también son capaces de transportar Fe^{2+} libre a través de las membranas mediante transportadores de la familia FeoB (Fig. 37). 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).

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 del mismo 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. Por otro lado, va a activar el almacenaje intracelular de hierro aumentando los niveles de ferritina. Y también disminuye la disponibilidad de hemo extracelular a través de la función de las proteínas hemopexina (HPX) y haptoglobina (HP). La HP une hemoglobina libre que es liberada durante la hemólisis y facilita su captura por el receptor CD163 presente en monocitos y macrófagos.

Cuando la capacidad de unión de la HP ha sido sobrepasada, la hemoglobina libre resulta oxidada a metemoglobina, y el grupo Fe^{3+} -protoporfina es liberado de la parte proteica. La HPX tiene mucha afinidad por este grupo hemo y el complejo hemo-HPX va a ser internalizado en las células a través del receptor LRP1 (“low-density lipoprotein receptor-related protein 1”).

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.

La inmunidad nutricional no está sólo limitada a estrategias destinadas a retirar Fe. El Mn^{2+} y el Zn^{2+} también son elementos vitales para las bacterias. Así, el Mn^{2+} 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^{2+} como defensa frente al ión superóxido. El Zn^{2+} 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^{2+} presentes en vertebrados, algunas de las cuales actúan en la defensa frente a las infecciones (Fig. 38). Así, la S100A7 (también conocida como psoriasina) es secretado por los queratinocitos e inhibe el crecimiento microbiano mediante la quelación de Zn^{2+} . 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) (Figura 38).

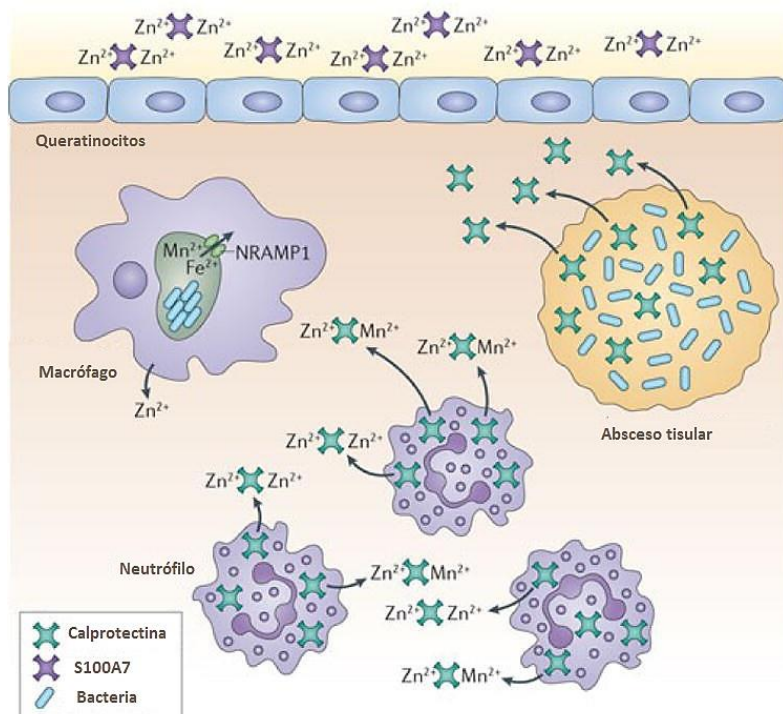


Figura 38. Quelación de Mn^{2+} y Zn^{2+} . Proteínas de la familia de S100 van a secuestrar el Mn^{2+} y el Zn^{2+} en la superficie de los epitelios y dentro de los abscesos producidos por las bacterias. S100A7 es liberada en la superficie epitelial, donde impide la invasión bacteriana gracias a su acción quelante de Zn^{2+} . En los tejidos profundos, la infección produce un reclutamiento de neutrófilos, que secretan calprotectina (consistente en S100A8 y S100A9) al absceso tisular. La calprotectina inhibe el crecimiento bacteriano mediante la quelación de Mn^{2+} y Zn^{2+} . La fagocitosis de las bacterias por parte de los macrófagos da lugar a una menor incorporación de Zn^{2+} y a un aumento del eflujo de Zn^{2+} desde el citoplasma de los macrófagos, y a un eflujo de Mn^{2+} y Fe^{2+} desde el fagosoma gracias a la acción de NRAMP1. Modificada a partir de figura en Hood & Skaar (2012).

Desde hace milenios se conocen los efectos antibacterianos del cobre, habiéndose usado con finalidades industriales para evitar el crecimiento de bacterias y habiéndose utilizando 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 Cu^+ resulta tóxico no es totalmente conocido, pero podría ser multifactorial, implicando tanto el daño oxidativo como la rotura de grupos Fe-S. Al igual que el Fe, Cu^+ puede experimentar la química Fenton, reaccionando con el peróxido de hidrógeno para producir radicales hidroxilo (OH^\cdot), que van a producir daños en los lípidos, las proteínas y el DNA ([Fig. 39](#)).

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 Cu^+ se acumula en los fagolisosomas de los macrófagos. El IFN- γ induce la expresión de CTR1 ("Cu⁺ transport protein 1"), que de forma activa adquiere Cu^+ del medio extracelular. ATOX1 se encarga de entregar el Cu^+ a ATP7A, un transportador de Cu^+ situado en la membrana fagolisosomal, y que se encarga de acumular Cu^+ dentro de este compartimento ([Fig. 39](#)).

Sin embargo, las bacterias también tienen mecanismos de detoxificación ante el Cu^+ , empezando por su poca necesidad fisiológica por el Cu^+ y por la localización de sus proteínas Cu^+ -dependientes fuera del citoplasma. Las micobacterias expresan una chaperona de Cu^+ citoplasmática (MymT), un transportador de Cu^+ (CtpV) y un transportador de la membrana de la micobacteria (MctB). CtpV y MctB son necesarias para la virulencia de bacterias como *M. tuberculosis*.

En las bacterias Gram- la resistencia a Cu^+ está mediada fundamentalmente por exportadores de Cu^+ . *S. typhimurium* expresa dos ATPasas de tipo P reguladas independientemente, CopA y GolT (CopA se expresa en presencia de Cu^+), así como una chaperona de Cu^+ periplasmática (CueP) y una oxidasa de cobre (CuiD/CueO). Esta última oxida el Cu^+ a Cu^{2+} en el periplasma. Además de CopA, *E. coli* expresa también un exportador de Cu^+ de la familia RND: CusABC.

En las bacterias Gram+ las estrategias de detoxificación son muy similares a las de las bacterias Gram-. En algunos, una segunda ATPasa tipo P, CopB, y una chaperona de Cu^+ citoplasmática, CupZ, es coexpresada junto a CopA ([Fig. 39](#)).

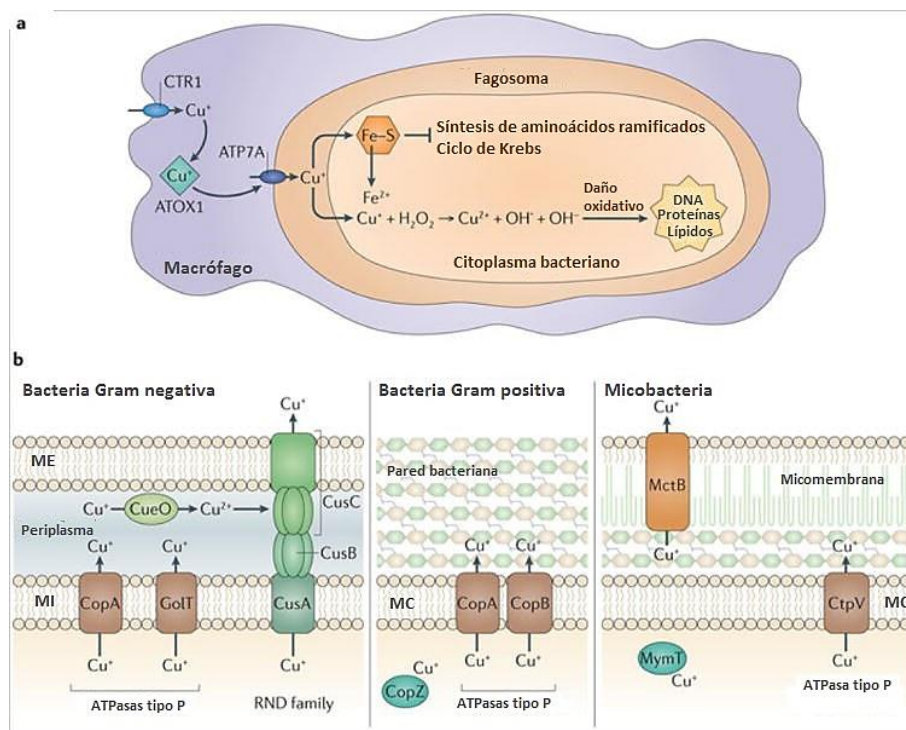


Figura 39. Nuevas perspectivas sobre los papeles desempeñados por el Cu^+ en la inmunidad innata. **a** | Mecanismos de intoxicación por Cu^+ dentro de los macrófagos. Después de la fagocitosis de la bacteria, el IFN- γ induce la expresión de la proteína importadora de cobre CTR1 (*Cu⁺ transport protein 1*). El Cu^+ es unido por ATOX1 y transportado hasta el transportador fagosomal de Cu^+ , el ATP7A. La acumulación de Cu^+ dentro del fagolisosoma contribuye a la muerte de las bacterias mediante múltiples mecanismos, incluida su interacción con los centros Fe-S de las proteínas y la posible generación de ROS. Esto lleva a la inhibición de los procesos metabólicos de la bacteria y al daño de sus proteínas, lípidos y DNA. **b** | Las bacterias tienen una gran diversidad de sistemas para detoxificar su citoplasma o periplasma cuando se encuentran en un medio rico en Cu^+ , incluidos sistemas de eflujo de Cu^+ (como el transportador CusABC de la familia de transportadores RND), oxidasas de cobre periplásmicas (como CueO) y chaperonas de Cu^+ citoplasmáticas (Como MymT). Muchas bacterias expresan múltiples sistemas de detoxificación que se regulan de manera independiente, generando una respuesta gradual a la intoxicación por Cu^+ . MI, membrana interna; ME, membrana externa; MC, membrana celular. Modificada a partir de figura en Hood & Skaar (2012).

8. 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 éste 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 esta vigilante frente a invasiones de microbios patogénicos. Existe una interacción recíproca entre el sistema inmunitario y el microbiota intestinal, en cuanto que el microbiota es fundamental para el adecuado desarrollo del sistema inmunitario y las respuestas inmunitarias, por su lado, van a regular la estructura y composición de la flora intestinal.

Una evidencia de la influencia del microbiota en el hospedador, es que mamíferos criados bajo condiciones estrictas de asepsia, no adquieren su flora natural y tienen un desarrollo anormal: hay deficiencias en el aparato digestivo (pared intestinal atrófica y motilidad alterada), metabolismo disminuido (corazón, pulmones e hígado de bajo peso, con gasto cardíaco bajo, baja temperatura corporal y cifras elevadas de colesterol en sangre), y sistema inmunitario inmaduro (niveles bajos de inmunoglobulinas, sistema linfático atrófico, etc.).¹

El cambio anormal en la composición del microbiota, llamado disbiosis, se ha observado en muchos tipos de enfermedades, entre ellas enfermedades autoinmunes. Las sociedades desarrolladas presentan una baja prevalencia de enfermedades infecciosas como resultado de mejoras en la higiene, así como del desarrollo de antibióticos y vacunas. En contraste, se observa un evidente aumento de la incidencia de alteraciones en el sistema inmunitario de carácter no infeccioso como enfermedades autoinmunes y respuestas alérgicas. Esta correlación inversa implica que los cambios en el ambiente que han provocado un trastorno del microbiota comensal podrían ser una causa potencial de la desregulación del sistema inmunitario.³

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. 41). En los individuos sanos, los principales filos de eubacterias presentes en el intestino son los Proteobacterias y Bacteroidetes, entre los Gram-negativos, y los Firmicutes, entre los Gram-positivos, mientras que 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, es decir, estos microorganismos comparten metabolitos, por ejemplo una bacteria puede producir hidrógeno y otra utilizarlo para producir metano. En este sentido, un factor crítico que define la distribución y composición del microbiota es el requerimiento de nutrientes de los microorganismos comensales. (Fig 40). Cuando la disponibilidad de nutrientes no es limitada, predominarán los comensales con una alta tasa de multiplicación, sin embargo, bajo condiciones de escasez de nutrientes los nichos serán ocupados por las especies mejor adaptadas. Por lo tanto, las probabilidades de un microorganismo determinado para ocupar estos nichos dependerá, en gran medida, de la capacidad de utilizar los nutrientes más eficientemente para cubrir sus necesidades metabólicas.

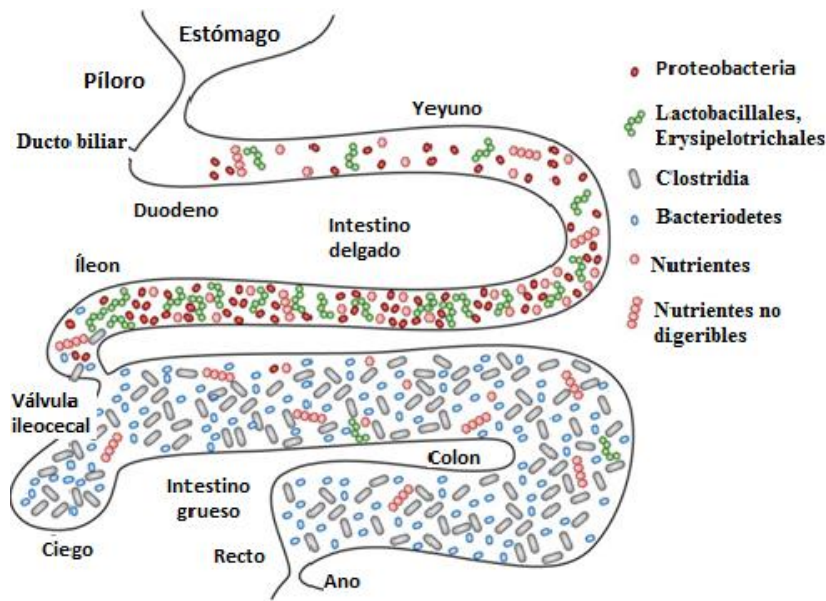


Figura 40. Localización de los grupos dominantes de bacterias dentro del intestino El intestino delgado es rico en nutrientes que son utilizados por los microbios y el hospedador para crecer. Protobacterias (principalmente enterobacterias), Lactobacillales y Erysipelotrichales (especialmente *Turicibacter*) son los microorganismos dominantes en el intestino delgado. Por el contrario, el intestino grueso es pobre en nutrientes y por tanto hospeda menor cantidad de estas bacterias, mientras que Bacterioidetes y Clostridia, que pueden utilizar como fuente energía las fibras que el hospedador no puede digerir, predominan en esta zona. Adaptada de **Kamada et al** (2013).

La colonización se inicia en el momento del nacimiento, siendo los primeros microbios de origen materno, y posteriormente se irá modificando en función de características genéticas del hospedador y por características ambientales como la dieta o la higiene. Factores como el modo de nacimiento (cesárea o parto natural), la alimentación del bebé, hospitalización, prematuridad y utilización de antibióticos determinan la composición del microbiota intestinal en fases tempranas de la infancia precoz.

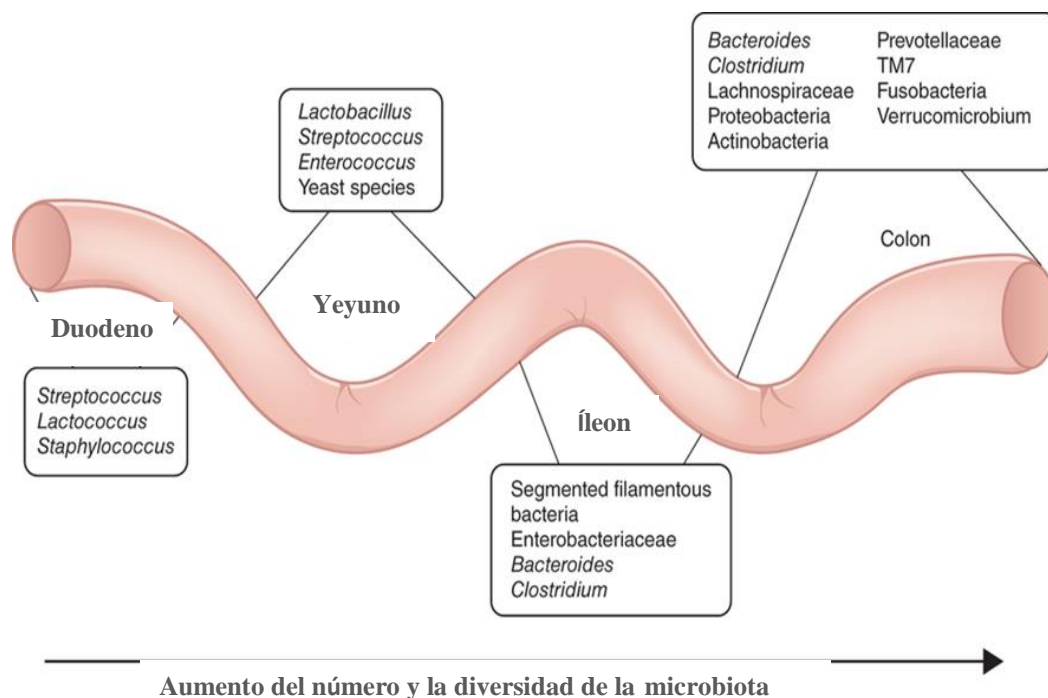


Figura 41. Distribución y composición del microbiota en el tracto intestinal. La cantidad y composición de las especies microbianas es diferente a lo largo del tracto intestinal. Filos, familias y géneros del microbiota están definidos para cada nicho particular. Nueve filos principales están representados en el microbiota intestinal: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Fusobacteria, Spirochaetes y TM7. La mayoría de las especies bacterianas que se encuentran en el intestino de mamíferos pertenecen a los filos Bacteroidetes o Firmicutes. Microorganismos eucariotas y arqueobacterias también pueden colonizar el intestino, aunque con menor abundancia. Adaptada de Kamada et al (2013).

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

Las bacterias comensales producen bacteriocinas, toxinas proteínicas que inhiben de forma específica a miembros de otras especies bacterianas. Por ejemplo,

E. coli produce una bacteriocina que inhibe el crecimiento de un patógeno relacionado, *E. coli* enterohemorrágica. 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 (Fig. 41). Por ejemplo, especies de *Bifidobacterium* bloquean la colonización por parte de *E. coli* patógena; de forma similar, un pH óptimo es necesario para el crecimiento de *Bacillus cereus* para la secreción de enterotoxinas.

Una estrategia alternativa utilizada por la comunidad microbiana comensal es el consumo preferencial de los nutrientes requeridos para el crecimiento de las bacterias patógenas.

Por ejemplo, *E. coli* comensal compite con la variante hemorrágica por ácidos orgánicos, aminoácidos y otros nutrientes (Fig. 42). Por otro lado, las bacterias comensales, a través de la producción de metabolitos específicos, puede también afectar 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 3 en varios serotipos de *Salmonella enterica*.

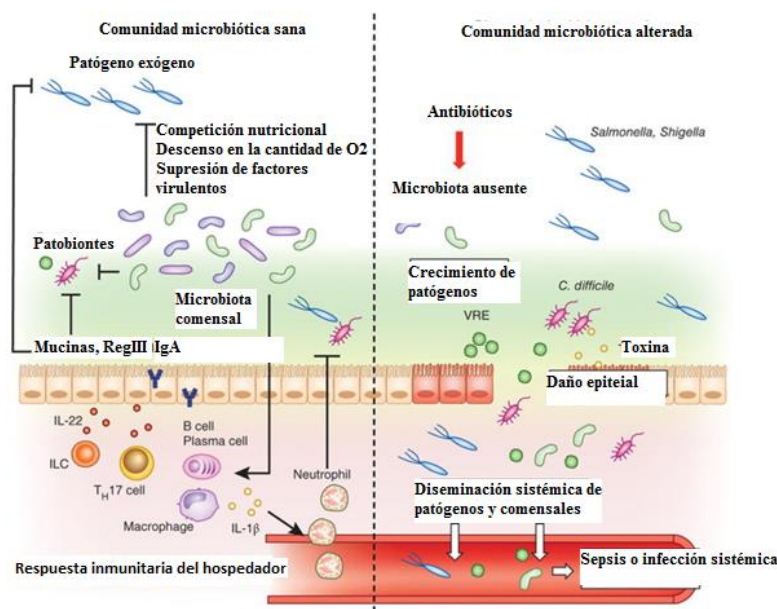


Figura 42. El microbiota comensal previene la colonización de patógenos exógenos y patógenos oportunistas. En los individuos sanos, las bacterias residentes ocupan nichos de colonización. El microbiota comensal evita la colonización de patógenos entéricos y patógenos oportunistas a través de diversos mecanismos como consumir el oxígeno residual o producir metabolitos antimicrobianos. El tratamiento con antibióticos u otros factores ambientales que perturban la comunidad microbiana comensal conduce a una disminución de la resistencia a la colonización de patógenos (como *Salmonella*, *Shigella*) y permite el crecimiento descontrolado de patógenos oportunistas (como *Clostridium difficile*, *Enterococcus* resistente a vancomicina) que tienen el

potencial de expandirse sistémicamente e inducir shock séptico y/o infección sistémica. Adaptada de Kamada et al (2013).

Las bacterias comensales también pueden modificar la expresión de factores de virulencia en los patógenos consumiendo el oxígeno residual. El microbiota comensal facilita la función de la barrera inmunitaria del hospedador potenciando la capa de mucus, induciendo moléculas antimicrobianas, como RegIIIβ y γ, y regulando la secreción de IgA. Las bacterias comensales también preparan a los macrófagos intestinales potenciando la producción de pro-IL-1β. La infección del patógeno produce la conversión de pro-IL-1β en la forma enzimáticamente activa de IL-1β, lo que promueve el reclutamiento de neutrófilos y la erradicación del patógeno.

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 (IECs, "intestinal epithelial cells"), 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. 43).

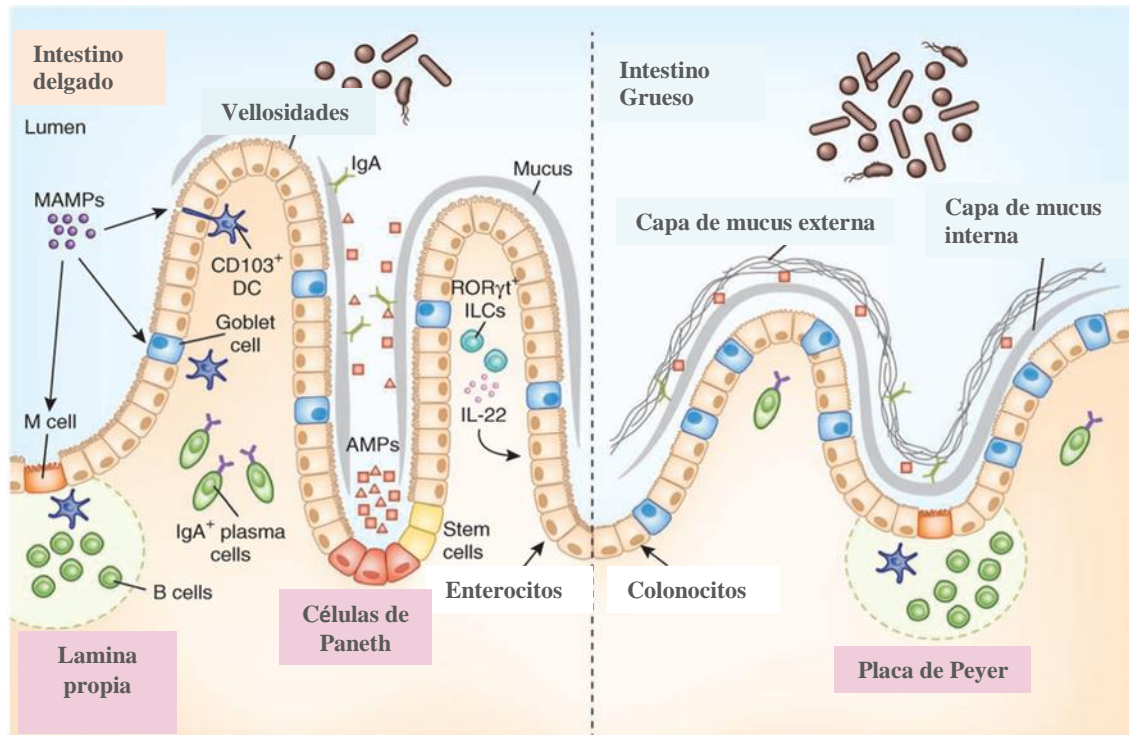


Figura 43. Confinamiento anatómico del microbiota a lo largo del intestino. El epitelio intestinal se compone de una única capa de enterocitos, el sistema inmunitario cumple el papel de proteger la integridad de esta capa. En el intestino delgado, debido a que los enterocitos tienen que absorber gran cantidad de nutrientes, la capa de mucus es discontinua y con pocas células de goblet. En esta zona las células de Paneth están en gran cantidad en las criptas y secretan AMPs, que pueden unirse a la capa de mucus. A través de esta barrera, las células M y las células de goblet pueden reconocer antígenos a través de MAMPs y presentárselos a células dendríticas. Las ILCs ROR γ t pueden reconocer señales microbianas y producir IL-22 colaborando así en la función de barrera de las IECs. El intestino grueso contiene una capa de mucus más gruesa y continua para compartimentar el microbiota, en la que la IgA y AMPs tienen un papel secundario. Adaptada de **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 copa ("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 (péptidos ricos en cisteína que poseen actividad antimicrobiana producidas fundamentalmente por leucocitos y células epiteliales)⁶ 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”) 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. Aunque no son CD4+, estas células presentan patrones de expresión de citoquinas similares a las subseries de linfocitos T ayudadores (T_H1, T_H2, T_H17 and T_H22), 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 (group 1 ILCs), GATA-3 (group 2 ILCs) or RORγt (group 3 ILCs). 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.

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. Las MAMPs estimulan la secreción epitelial de IL-33, TGF-β, TSLP, BAFF y APRIL, que promueven el desarrollo de la respuesta inmunitaria celular tolerogénica frente al microbiota.⁵ 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- β , promueve el cambio de clase en los linfocitos B que comienzan a producir IgA, inmunoglobulina que es transportada al lumen intestinal mediante transcitosis.

En este entorno la integridad de la barrera de las IECs se ve reforzada por la secreción de IL-22 por ROR γ t y por las ILCs.⁵

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. Cuando esto ocurre el epitelio puede secretar IL-1 e IL-6 en respuesta a señales de peligro. La secreción de IL-12 e IL-23 por las células dendríticas y los macrófagos promueve una respuesta TH1y TH17. Estas células T helper secretan altos niveles de IFN- γ e IL-17A, respectivamente, además las ILCs T-bet+ también se activan para producir IFN- γ . En esta situación, una brecha en la barrera epitelial producida por el microbiota también puede conducir a niveles más altos de células B secretoras de IgG.⁵ (Fig. 44).

Estamos comenzando a entender la naturaleza de las interacciones entre nuestro organismo y el microbiota, pero son necesarios más estudios para entender el mecanismo del microbiota en la regulación del sistema inmunitario en su conjunto. Este conocimiento podría ayudar a la predicción del comienzo y la progresión de muchas enfermedades, así como al desarrollo de terapias para aquellas enfermedades en las que se ha producido un trastorno en la relación entre el microbiota y el hospedador, causado por cambios en la dieta, antibióticos, cirugía o trasplantes. Esto puede permitir modificar y reconstruir el microbiota de forma que se reestablezca una comunidad microbiana sana y estable.

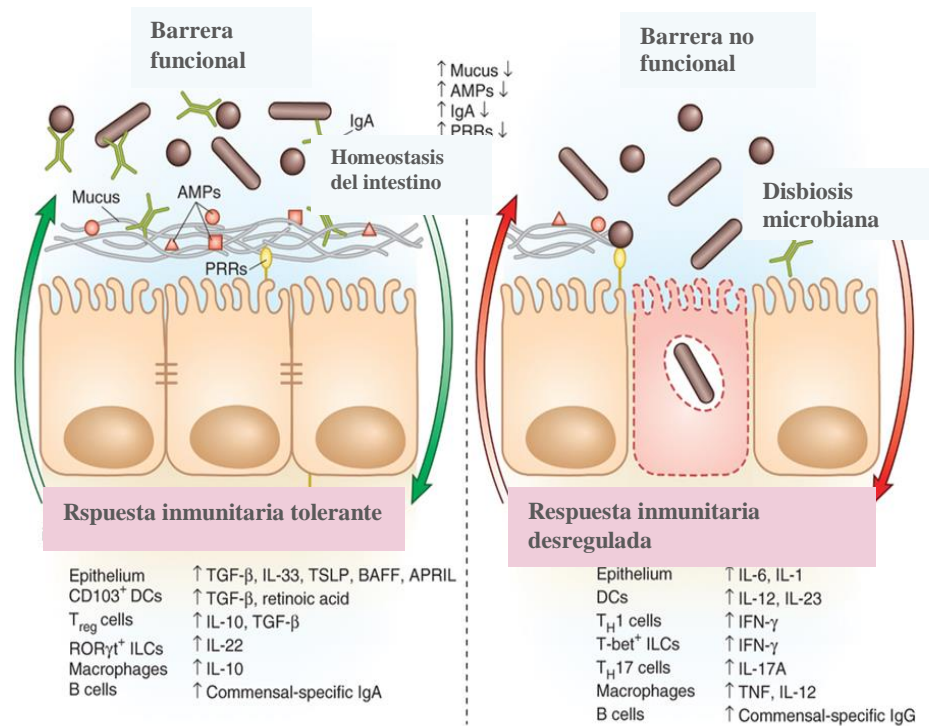


Figura 44. Las barreras innatas garantizan una respuesta tolerante al microbiota. La presencia de una barrera funcional, con cantidades normales de PRRs, mucus, AMPs e IgA secretada, promueve la homeostasis intestinal con el microbiota. En situaciones de inmunodeficiencia o síndromes inflamatorios con 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 **Brown et al (2013)**.

BIBLIOGRAFÍA

- **Alekshun, M.N., and Levy, S.B.** (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance.
- **Alonso, A., Sánchez, P. and Martínez, J. L.** (2001), Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, 3: 1–9.
- **Andersson, D.I. and Hughes, D.** (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 12: 465-478.
- **Andrews, J. M.** (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (Suppl. 1):5-16.
- **Avendaño, Carmen; López** (2001) [Primera edición 1993]. *Introducción a la química farmacéutica* (2ª edición). Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España. pp. 568–572.
- **Belizário JE, Napolitano M.** (2015) Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Frontiers in Microbiology*;6:1050.
- **Benjamin P. Willing, Shannon L. Russell & B. Brett Finlay.**(April 2011) *Nature Reviews Microbiology* 9, 233-243)
- **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.
- **Bordenstein SR, Theis KR.** (2015). Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. Waldor MK, ed. *PLoS Biology*.13(8):e1002226
- **Brian L. Hollenbeck, Rice LB.** Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*. 2012 August 15;3(5):421-569.
- **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 Ledeboer, 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. *Cell* 128: 1037-1050.
- **Dan I. Andersson & Diarmaid Hughes** (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology* 12, 465–478.
- **Falkow, S.** (1990) The "Zen" of bacterial pathogenicity. En: *Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis* (B.H. Iglewski y V.L. Clark, eds). pp.3-9. Academic Press, Inc., California.
- **Florez, Jesús.** (1998). *Farmacología humana* (3ª ed. edición). Masson. p. 1062 (1997)
- **Guarner F.** (2007) Papel de la flora intestinal en la salud y la enfermedad. *Nutr Hosp*; 22 (Supl. 2):14-9.
- **Hood, M.I. and Skaar, E.P.** (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* 10: 525-537.
- **K. Labbé & M. Saleh** (2008). Cell Death and Differentiation. "Cell death in the host response to infection. *Nature*, 15, 1339–1349
- **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.
- **LEHNINGER PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA.** DAVID L. NELSON & MICHAEL M.COX. QUINTA EDICIÓN (2009)

- **Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J.** (1998) *Biología de los microorganismos* (8ª Ed.) Prentice Hall Iberia, Madrid. Cap. 21, 865-901.
- **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.
- **Mazmanian SK, Lee YK.** (2014) Interplay between Intestinal Microbiota and Host Immune System. *J Bacteriol Virol.*
- **Montalban-Arques A, De Schryver P, Bossier P, Gorkiewicz G, Mulero V, Gatlin DM 3rd, Galindo-Villegas J.** (2015) Selective Manipulation of the Gut Microbiota Improves Immune Status in Vertebrates. *Frontiers in Immunology*;6:512.
- **Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, Buchanan SK.** *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:43-60. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134247
- **Parrow, N.L., Fleming, R.E. and Minnick, M.F.** (2013). Sequestration and scavenging of iron in infection. *Infect Immun* 81: 3503-3514.
- **RUIZ ALVAREZ, Vladimir; PUIG PENA, Yamila y RODRIGUEZ ACOSTA, Mireida.** (2010) Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Rev Cubana Invest Bioméd* [online]. 2010, vol.29, n.3, pp. 364-397. ISSN 1561-3011.
- **Torres C., Cerdano E** (2010) Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. *Elsevier Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(8):541–553
- **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.

En la red:

- <http://epidemiologiamolecular.com/defensinas/>
- <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/antibiotics.html>
- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- <http://www.who.int/features/qa/75/es/>
- <https://es.wikipedia.org/wiki/Haptoglobina>