



FACULTAD DE
CIENCIAS

MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

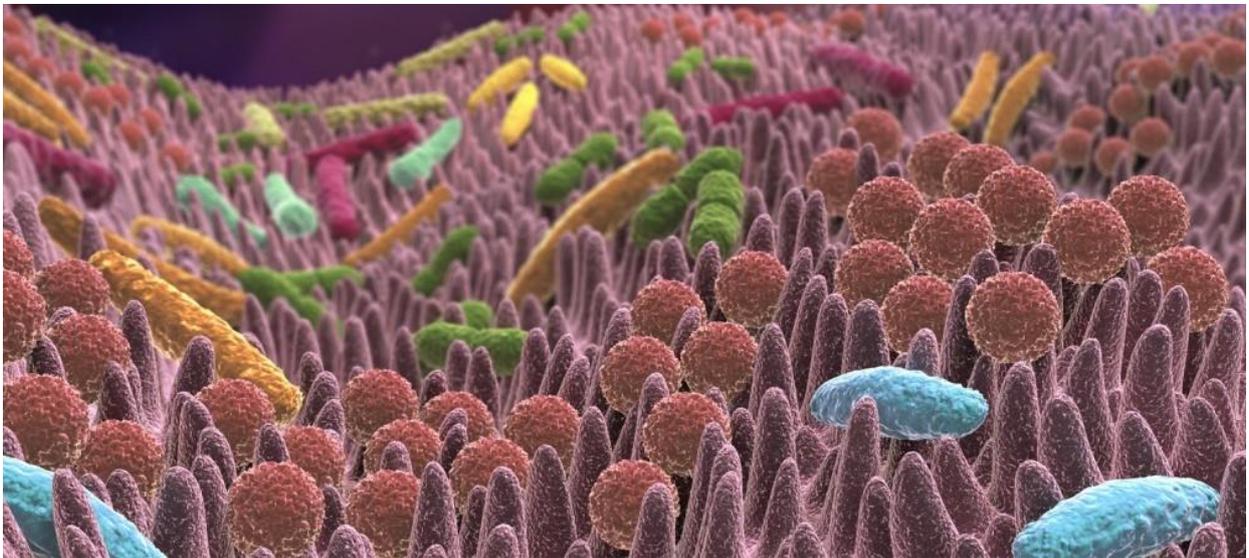
Grado en Bioquímica

Departamento de Biología Molecular

U.A.M. © 2017



TEMA 9. INTRODUCCIÓN A LA BACTERIOLOGÍA



Rafael Amieva Gómez

Clara De la Rosa Del Val

Lucía Fraile García

Marina Guillén Yunta

Manuel Montero Gómez de las Heras

Cristina Rodilla Hernández

Índice

1.	INTRODUCCIÓN.....	3
2.	CONCEPTOS Y DEFINICIONES.....	3
2.1.	Infección.....	3
2.1.1.	Colonización.....	3
2.1.2.	Infección inaparente.....	3
2.1.3.	Enfermedad infecciosa.....	4
2.1.4.	Términos clínicos relacionados con enfermedades infecciosas.....	4
2.2.	Epidemiología y su terminología.....	4
3.	PATOGENICIDAD.....	5
3.1.	Determinantes extracromosomales de patogenicidad.....	7
3.2.	Genes antivirulencia.....	8
4.	ESTRATEGIAS PARA UNA ADAPTACIÓN MICROAMBIENTAL RÁPIDA.....	10
4.1.	Variación genética frente a regulación génica.....	10
5.	DIAGNÓSTICO.....	11
5.1.	Aplicación de las nuevas tecnologías al diagnóstico en el laboratorio de microbiología clínica.....	12
5.1.1.	Métodos de diagnóstico basados en la amplificación específica de secuencias.....	13
5.1.2.	Métodos de diagnóstico basados en “microarrays”.....	17
5.1.3.	PCR digital.....	19
5.1.4.	Métodos basados en la secuenciación de ácidos nucleicos.....	20
5.1.5.	Métodos basados en la espectrometría de masas.....	20
6.	ANTIBIÓTICOS.....	22
6.1.	Los antibióticos y el microbiota.....	25
6.2.	Características generales de los antibióticos.....	28
6.3.	Blancos para las principales clases de drogas antibacterianas.....	29
6.3.1.	Biosíntesis de la pared celular.....	30
6.3.2.	Síntesis de proteínas.....	31
6.3.3.	Replicación y reparación del DNA.....	32
6.4.	Estrategias de las bacterias para neutralizar la acción de los antibióticos.....	32
6.4.1.	Bombeo hacia fuera de antibióticos.....	33
6.4.2.	Destrucción del antibiótico.....	35
6.4.3.	Introducción de cambios en la estructura de la molécula blanco.....	35
6.5.	Desarrollo de nuevas drogas que eviten la resistencia.....	37

6.6. Origen y evolución de los genes de resistencia.....	39
6.7. Persistencia bacteriana como mecanismo de resistencia a antibióticos.	40
7. LA PIROPTOSIS: MECANISMO DE DEFENSA FRENTE A LA INFECCIÓN.....	44
8. INMUNIDAD FRENTE A LOS PATÓGENOS A TRAVÉS DE LA LIMITACIÓN NUTRICIONAL.....	49
8.1. Hierro.....	49
8.2. Manganeso y Zinc.....	54
8.3. Cobre.....	55
9. RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA INMUNITARIO Y LA FLORA INTESTINAL.....	56
10. BIBLIOGRAFÍA.....	63

1. Introducción.

Dentro del mundo microbiano, sólo unas pocas especies son patógenas. La mayoría de los microorganismos desempeñan actividades esenciales en la naturaleza y muchos están íntimamente asociados a plantas o animales mediante relaciones estables y beneficiosas. En el caso de los humanos, más concretamente, las poblaciones de microorganismos establecidas en el tracto intestinal (microbiota) son muy importantes para aspectos fisiológicos, como el desarrollo y la homeostasis del sistema inmunitario, para el control por competición de nicho de organismos potencialmente patógenos, y en aspectos metabólicos para el procesamiento de metabolitos

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} microorganismos. Y uno se puede preguntar, ¿qué somos, eucariotas o procariotas? Quizás nosotros seamos las “patas” de una macrocolonia de bacterias.

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.

2. Conceptos y definiciones.

2.1. 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:

2.1.1. 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 por parte del hospedador.

2.1.2. 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.

2.1.3. Enfermedad infecciosa.

Se da cuando se ha establecido una infección y además se producen alteraciones o daños más o menos graves en el hospedador, que se manifiestan por diversos síntomas clínicos. Así, mientras que una infección no siempre implica el desarrollo de una enfermedad, una enfermedad sí requiere del establecimiento de una infección.

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

2.1.4. Términos clínicos relacionados con enfermedades infecciosas.

Se conoce como periodo de incubación al tiempo que pasa desde que el hospedador entra en contacto con el microorganismo patógeno hasta que se desarrollan signos o síntomas de la enfermedad. Según el patógeno varía mucho. Por ejemplo, el cólera (causado por *Vibrio cholerae*) tiene un tiempo de incubación de 1-3 días, mientras que con la tos ferina (causada por *Bordetella pertussis*) se tarda 7-14 días en desarrollar síntomas. No hay que confundir el periodo de incubación con el periodo de latencia, que consiste en el tiempo entre que se entra en contacto con el microorganismo y se establece la infección. Así, el periodo de latencia es más corto que el de incubación.

Etiología: estudio de las causas de la enfermedad

Semiología o sintomatología: estudio de los síntomas de una enfermedad

Septicemia: estado patológico debido a la presencia de agentes patógenos y sus toxinas en la sangre

2.2. Epidemiología y su terminología.

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

La **tasa de prevalencia** refleja la proporción total de individuos infectados (nuevos y antiguos, y no implica que hayan desarrollado la enfermedad) 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. También refleja la virulencia del patógeno, con patógenos más virulentos hay mayor tasa de mortalidad que con patógenos más benignos

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, con limitación geográfica, y con poca incidencia.

Los **reservorios** son entornos en los que los agentes infecciosos permanecen vivos y viables, y a partir de los cuales puede surgir el contagio de la infección a los individuos. Los reservorios pueden ser tanto animados como inanimados. Un ejemplo de reservorio inanimado sería el de la bacteria *V. cholerae* en agua salobre, y un ejemplo de reservorio animado serían los roedores para *Yersinia pestis*, causante de la peste.

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

3. 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* (causa gonorrea, enfermedad de transmisión sexual), *Salmonella* (gastroenteritis o fiebres entéricas), *Shigella* (gastroenteritis), *Brucella* (brucelosis, con fiebres periódicas), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria) y *V. cholerae* (cólera), son aquellos que causan infección en todos los casos.

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 como *Klebsiella* (pneumonía, infecciones urinarias, meningitis), *Enterobacter* (infecciones respiratorias y urinarias), *Serratia* (infecciones respiratorias y urinarias), *Proteus* (infecciones urinarias y sepsis), *Pseudomonas* (neumonía, infecciones urinarias), cocos grampositivos como *Staphylococcus* (conjuntivitis, meningitis, intoxicaciones alimentarias, infecciones de la piel), *Streptococcus* del grupo D (bacteremia y endocarditis), anaerobios (*Bacteroides*, infecciones gastrointestinales como apendicitis) e incluso virus (*Herpesviridae*), protozoos y hongos (*Candida*).

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

1) **Bacterias extracelulares**, se multiplican en los espacios intercelulares. Sólo pueden producir la infección si elaboran sustancias o presentan mecanismos que inhiban la fagocitosis o el hospedador presenta deficiencias en su sistema fagocitario (*Staphylococcus*, *Neisseria*, *Bacillus*, *Clostridium*).

2) **Bacterias intracelulares facultativas**, se multiplican en el medio extracelular y, si se produce la fagocitosis, presentan mecanismos que interfieren con los procesos de digestión intracelular y pueden permanecer viables durante mucho tiempo en el interior del fagocito (*Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella*, *Listeria*).

3) **Bacterias intracelulares obligadas o estrictas**, sólo se pueden multiplicar en el interior de las células que les suministran la energía y parte de los mecanismos de biosíntesis, y no sobreviven por mucho tiempo fuera de las células del hospedador (*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.

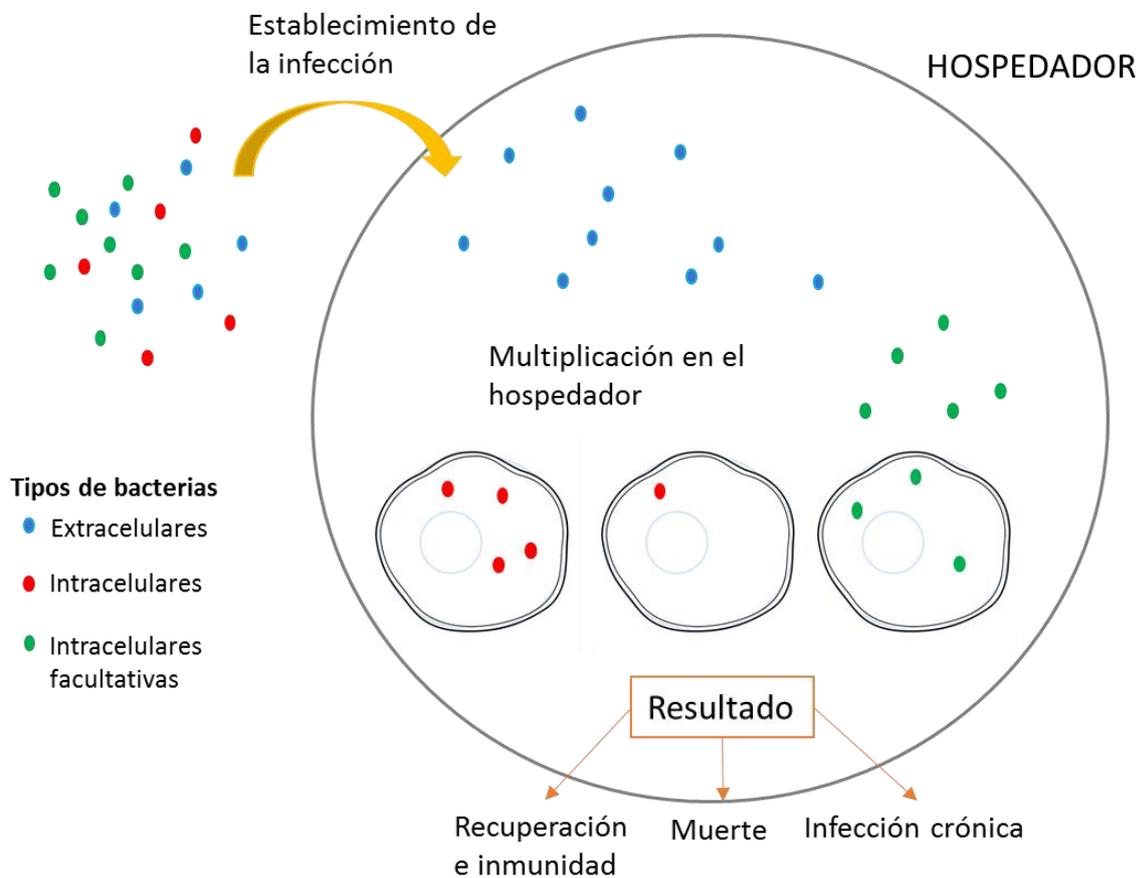


Figura 1. Tipos de bacterias de acuerdo al lugar donde se multiplican

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 cutáneomucosa 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**.

3.1. 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** (Fig. 2). 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 presentes de manera natural en el medio 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, protistas, plantas y animales) en ambientes naturales. Dada la gran variedad de hábitats y estrategias de adaptación para la supervivencia presentes en las bacterias, todos los mecanismos necesarios para la patogenicidad evolucionaron como estrategias de adaptación al medio, y es su combinación lo que puede causar que una bacteria se vuelva patógena para un organismo determinado.

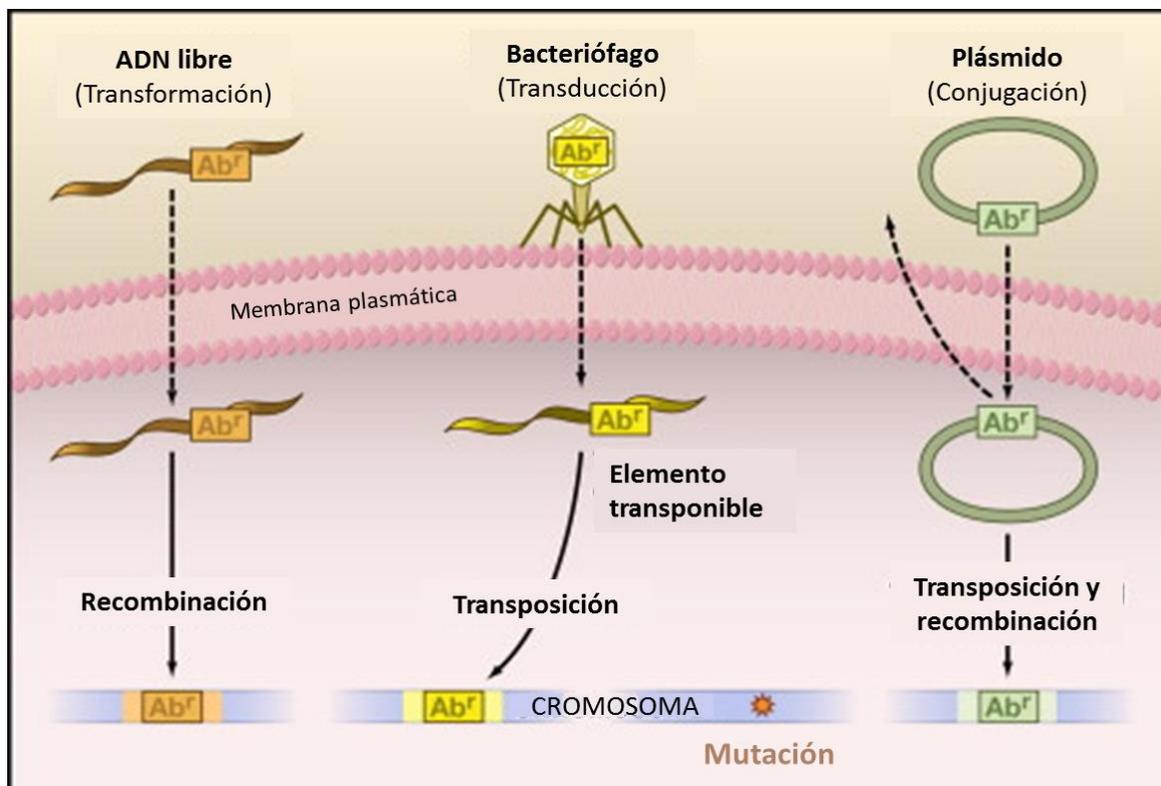


Figura 2. **Mecanismos de adquisición de genes de resistencia.** Adaptada de Alekshun and Levy, 2007

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 son los genes de resistencia a antibióticos. Aunque nos referiremos más adelante a ellos, una característica de los mismos es que pueden ser transferidos entre especies, géneros e incluso reinos. En este sentido, con frecuencia, los genes de resistencia se suelen encontrar agrupados en integrones (plásmidos, transposones, agrupaciones genómicas) que son fácilmente movilizables. Además, las bacterias, particularmente, tienen una gran capacidad de movilizar genes a través de diversos mecanismos (Fig. 2): transformación (captura de DNA presente en el medio), transducción mediada por fagos y conjugación (intercambio de DNA entre organismos).

3.2. 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 deletados 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 (Fig. 3). 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 o vías génicas no son necesarios en el 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, deletado o regulado de forma diferencial para impedir que su expresión interfiera con la virulencia del patógeno.

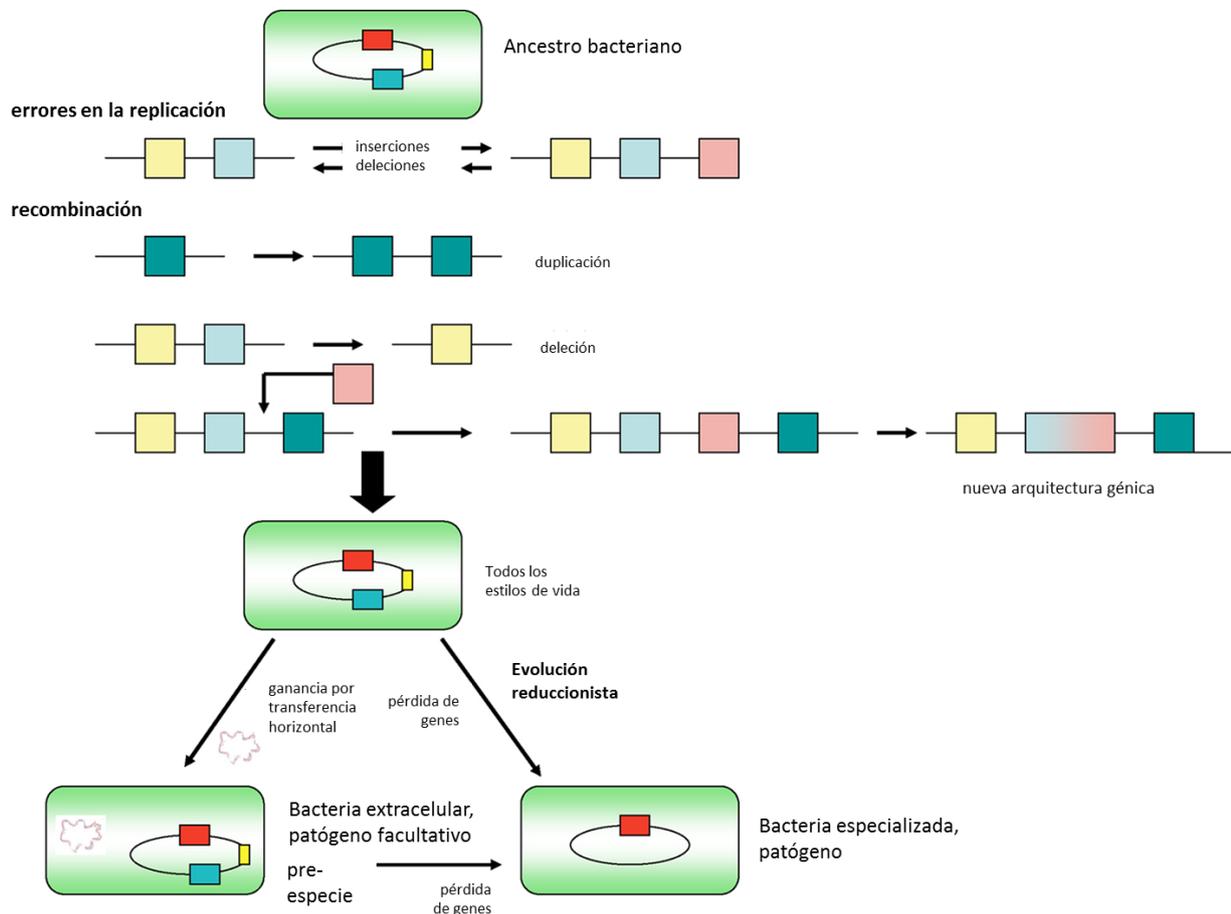


Figura 3. Esquema de la evolución de las bacterias hacia patógenos por la ganancia y la pérdida de genes. Adaptada de Georgiades et al (2011)

Podemos encontrar un claro ejemplo de cómo la pérdida de ciertos genes puede ser beneficiosa para la patogenicidad en *S. enterica* (que causa gastroenteritis y fiebres entéricas o tifoideas) (Fig. 4). *Salmonella* no contiene en su genoma el operón *lac* ni el represor del operón *lacI*, a pesar de que *Escherichia coli*, cercana evolutivamente, sí que lo posee, lo que sugiere que se perdió en el proceso de reducción del genoma al convertirse en una bacteria patogénica. Sin embargo, a priori puede parecer que este operón otorga la ventaja de ser capaz de utilizar la lactosa como sustrato energético. Esto sugiere que *Salmonella* perdió estos genes en su evolución divergente con respecto a *Escherichia*, y que su pérdida debe proporcionar más beneficios que la capacidad potencial de digerir la lactosa. Así, se ha observado que *lacI*, el represor del operón *lac*, interfiere con la expresión de ciertos genes de virulencia en *Salmonella*, en concreto con aquellos presentes en la isla de patogenicidad 2. *LacI* sería por tanto un gen antivirulencia que en la evolución de *S. enterica* como organismo patógeno se perdió, otorgando a la bacteria capacidades más patogénicas. La hipótesis de por qué además de *lacI* se perdió todo el operón *lac* es que, en ausencia del represor, la expresión

continuada del operón aun en ausencia de lactosa disminuye la salud de las bacterias, por el gasto energético innecesario.

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.

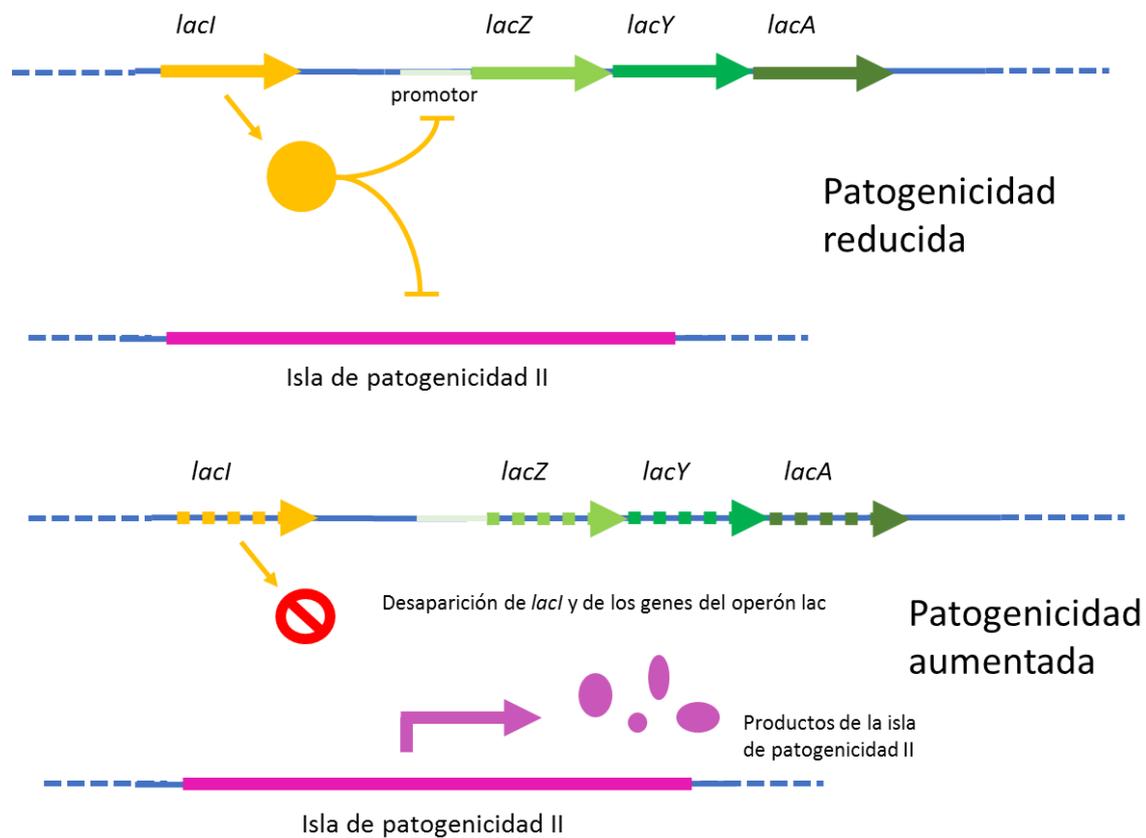


Figura 4. Representación de la pérdida de genes antivirulencia en *S. entérica*

4. Estrategias para una adaptación microambiental rápida.

4.1. 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. 5):

- 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 mostrará muy probablemente una adaptación mejorada al microambiente.

- 2) La segunda estrategia de **adaptación**, la regulación génica, tiene lugar en todo el conjunto de la población bacteriana. En respuesta a un determinado estímulo ambiental, tal como temperatura, osmolaridad, sustancias específicas, la bacteria altera la expresión de genes regulables.

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

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

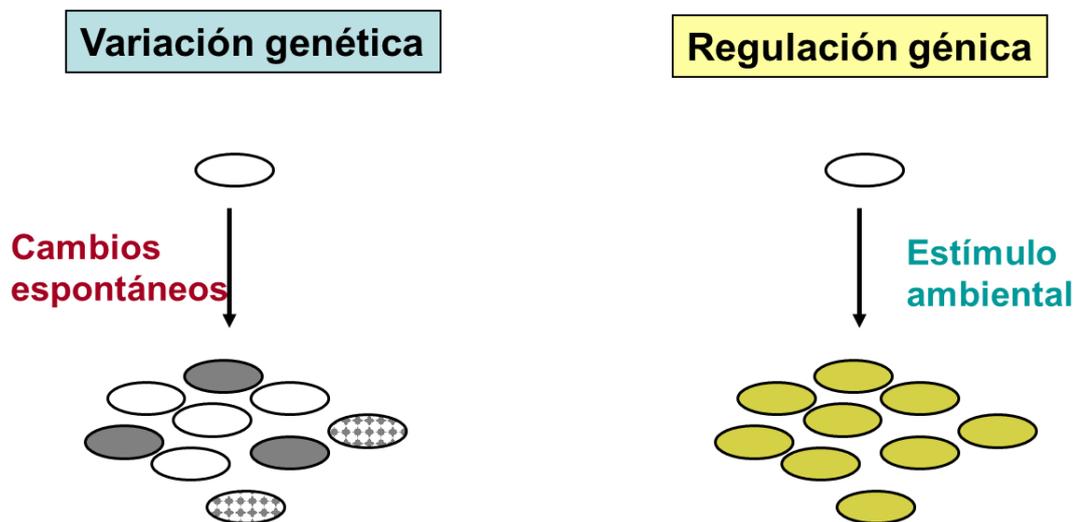


Figura 5. Estrategias de adaptación ambiental

5. Diagnóstico.

En la Figura 6 se resumen los métodos clínicos y diagnósticos empleados más frecuentemente en el aislamiento e identificación de patógenos. Esta labor es realizada por el microbiólogo clínico y su mayor preocupación es la de identificar los microorganismos presentes en las muestras clínicas lo más rápido posible. Estos especialistas también determinan la susceptibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos. La microbiología clínica ha incorporado distintos conocimientos procedentes de áreas tan diversas como la bioquímica microbiana, la inmunología, la biología molecular, etc.

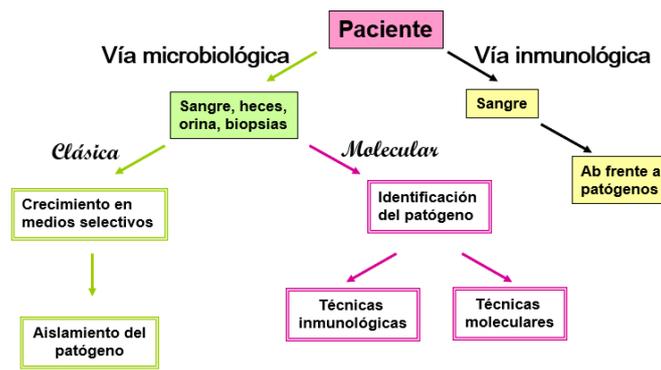


Figura 6. **Métodos clínicos y diagnósticos empleados en el aislamiento e identificación de patógenos**

5.1. 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 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. 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.

5.1.1. 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 (Fig. 7).

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”.

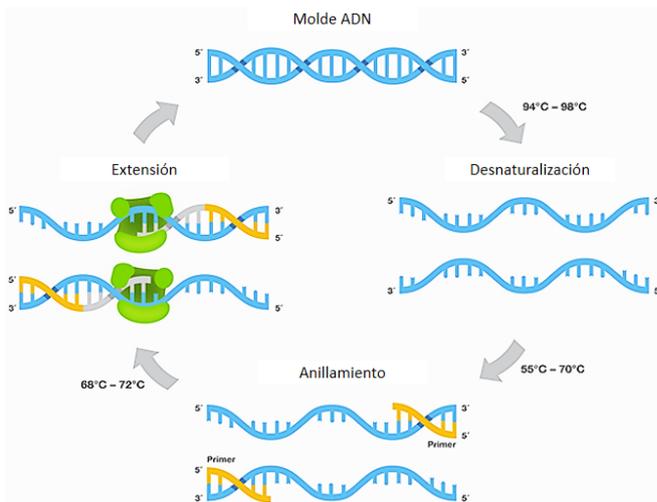


Figura 7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La técnica comienza con la desnaturalización del ADN de la muestra a 94-98°C durante 1-3 min, de forma que las dos hebras queden separadas. A continuación, a una temperatura óptima se produce la unión específica de los cebadores con sus secuencias diana en el ADN. Después, se extienden los extremos 3' de los cebadores de forma complementaria a la cadena molde de ADN. A continuación, la temperatura se sube hasta la óptima para la polimerasa elegida (para las polimerasas termoestables suele estar entre 70-75°C). Modificada a partir de la figura disponible en ThermoFisher.com

La **Amplificación Mediada por Transcripción (TMA, "Transcription-Mediated Amplification")** difiere de la PCR convencional en que utiliza como blanco una molécula de RNA (mRNA o rRNA), que puede estar presente en un alto número de copias en la célula. En la mezcla de reacción se incluye una transcriptasa reversa y la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Para la amplificación del molde se emplea un oligo que contiene la secuencia promotora de la polimerasa T7, de tal manera que luego el enzima es capaz de generar miles de copias de RNA a partir de las moléculas de cDNA que produce la retrotranscriptasa. En la Figura 8 se ilustra el proceso.

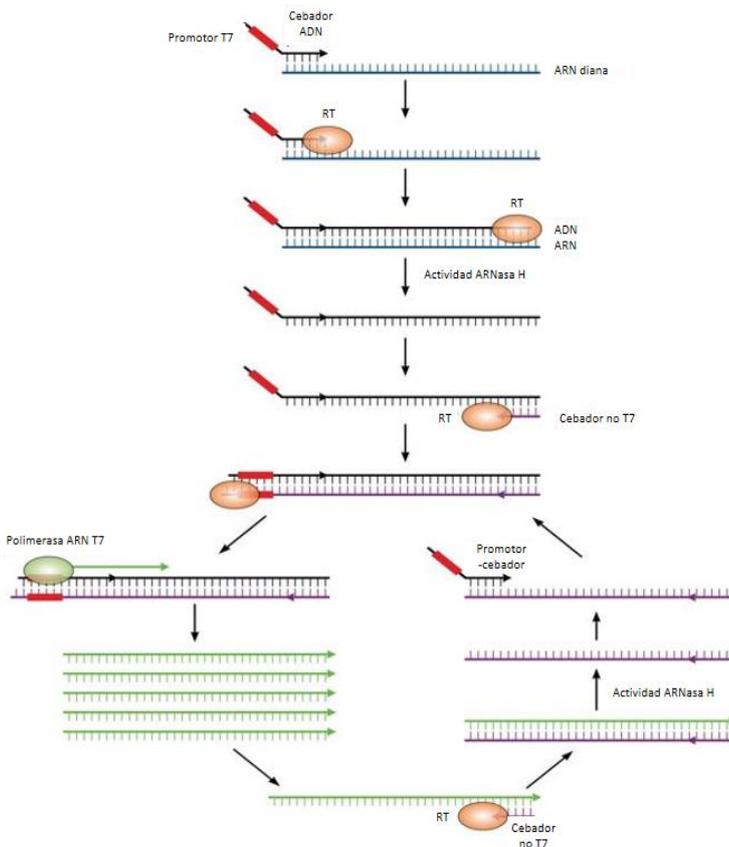


Figura 8 Amplificación mediada por transcripción (TMA). Se hibrida el ARN diana con un cebador que contiene la secuencia promotora de la polimerasa del fago T7. La unión de la transcriptasa reversa hace que se sintetice la copia complementaria en ADN, extendiendo desde el cebador y formando un dúplex ARN-ADN. A continuación, debido a la acción de la ARNasa H se degrada el molde de ARN. Se hibrida un segundo cebador a la cadena de cDNA para que la RT genere la copia complementaria, incorporando también la secuencia promotora de la polimerasa del fago T7. Esta ARN polimerasa se une a su secuencia promotora y sintetiza entre 100-1000 copias de ARN. Estas nuevas copias de ARN serán diana de los cebadores y de la RT, generando nuevos ciclos de amplificación del molde ARN inicial. Modificada a partir de la figura en Bachun & Ledebuer (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 comienza la amplificación, y a continuación la pareja de iniciadores externos inicia una ronda de replicación que desplaza el producto inicial, regenerando el molde de cadena sencilla sin la necesidad de una desnaturalización térmica (Fig. 9).

Figura 9. Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). (A) LAMP requiere de 4 cebadores complementarios a 6 regiones del molde (F1, F2, F3, B1, B2 y B3). FIP y BIP son cebadores internos que se unen respectivamente a las regiones F1-F2 y B1-B2. B3 y F3 son los cebadores externos que se unen a regiones hacia el 5' de los cebadores internos. (B) La amplificación se inicia con la hibridación entre los cebadores y la cadena molde. A continuación, se empieza a extender la copia a partir de los cebadores internos. El anillamiento de los cebadores externos F3 y B3 desplaza la hebra iniciada por FIP y BIP. La hebra desplazada forma una estructura bucle en 5' por complementariedad de secuencia. Esta estructura se denomina “pesa de gimnasio”. (C) Esta estructura sirve como molde para las siguientes rondas de replicación. Modificada a partir de la figura en Bachun & Ledebauer (2014)

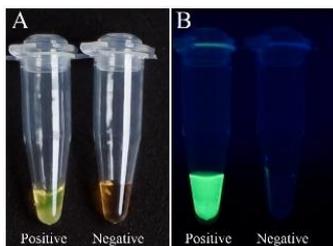
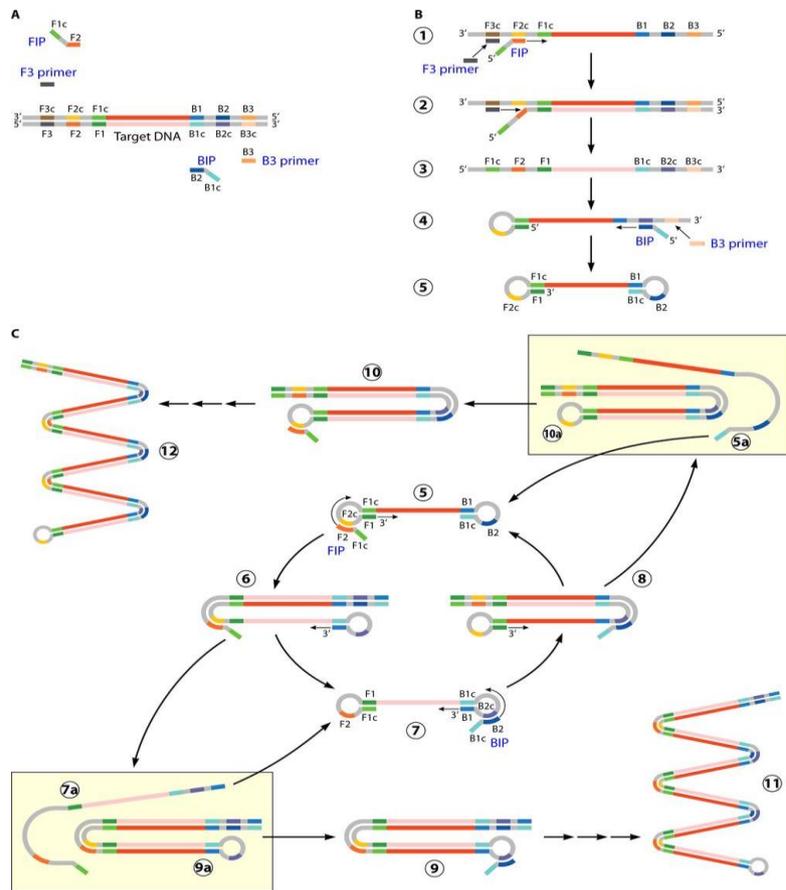


Figura 10. La adición de 1 µl de SYBR green I al tubo de reacción tras la reacción LAMP permite el análisis visual de los resultados bajo luz natural (A) o radiación UV (B). El color cambia de naranja oscuro (reacción negativa) a verde claro (reacción positiva) (A) y una fluorescencia brillante indica una reacción positiva (B). SYBR green I es un colorante derivado de cianina que se une a ADN. Figura Nie et al. (2012)

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. También se puede visualizar la amplificación, añadiendo colorantes de unión a ADN a la mezcla de reacción, como es el caso de SYBR-green (Fig. 10).

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. 11).

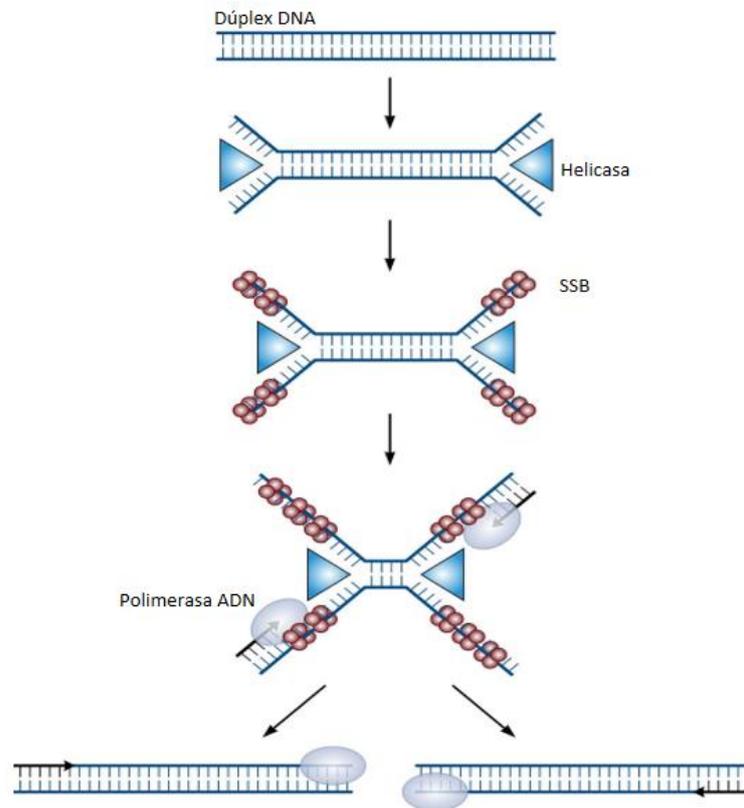


Figura 11. Amplificación dependiente de helicasa (HDA). HDA utiliza la helicasa UvrD (triángulos azules) y MutL, que ayuda a unir UvrD al ADN. Ambas son proteínas de E. coli que actúan independientemente de la temperatura. El complejo UvrD-MutL abre la doble hélice de ADN, mientras que las proteínas SSB (Single-strand binding proteins) (círculos rojos) estabilizan esta estructura. Los cebadores específicos pueden anillar con su diana en el ADN y la polimerasa de ADN (círculo gris) empieza a copiar la secuencia, extendiéndola desde el cebador. Estas copias de ADN sirven como molde para las siguientes rondas de amplificación. Modificada a partir de la figura en Bachun & Ledebner (2014)

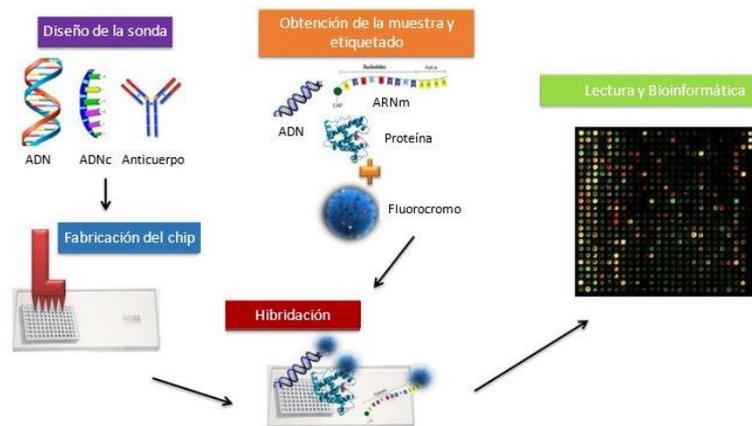
El complejo UvrD/MutL desenrolla el DNA de cadena doble, y a continuación las proteínas SSB se van a encargar de impedir la asociación de las cadenas complementarias. La unión de los iniciadores a la molécula blanco va a permitir la extensión por la DNA polimerasa para generar una copia. El amplicón 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.

5.1.2. Métodos de diagnóstico basados en “microarrays”.

Estos métodos tienen el objetivo de detectar un gran número de blancos en el mismo ensayo de detección de ácidos nucleicos. Los ensayos de microarrays pueden dividirse a su vez en dos clases: los ordenamientos en fase sólida, que se basan en la detección espacial de blancos ordenados sobre una superficie sólida; y los ordenamientos en fase líquida que utilizan sondas de captura específicas de blanco que están conjugadas a microsferas que son detectadas mediante citometría de flujo (Fig. 12).

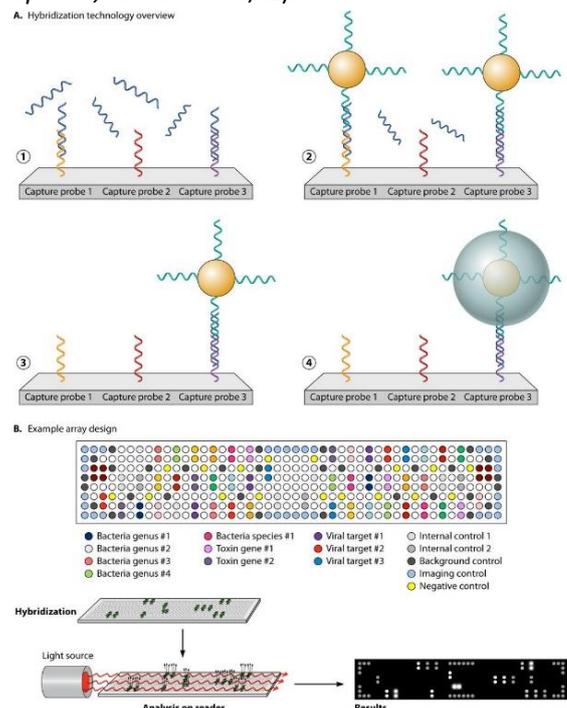
Figura 12. Métodos de diagnóstico basados en microarreglos (microarrays). Modificada a partir de la figura en Bautista-de Lucio et al. (2013)



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

Los microarrays o microarreglos clásicos se basan en la utilización de oligonucleótidos sintéticos (sondas de captura) inmovilizados sobre una superficie sólida, que puede ser un portaobjetos de vidrio o una membrana de nitrocelulosa. El número de sondas de captura puede variar desde un centenar hasta más de un millón. Por lo general se incluyen varias sondas para cada microorganismo a diagnosticar para aumentar la especificidad. Un ejemplo de este sistema se muestra en la Figura 13, que corresponde al sistema Verigen (*Nanosphere, Northbrook, IL*).

Figura 13. **Microarray en fase sólida de Verigene.** (A) Sondas específicas de una hebra son ordenadas espacialmente e inmovilizadas en la superficie de un portaobjetos de cristal. La secuencia diana de estas sondas puede provenir de una amplificación por PCR o de ácidos nucleicos extraídos. Esta diana es desnaturalizada y se aplica sobre el portaobjetos. Si en la muestra está la diana, ésta se anillará a su sonda específica. Las microsferas de oro, cubiertas con hebras sencillas de un ácido nucleico complementario a otra región de la secuencia diana, son añadidas y se unen al complejo sonda-secuencia diana. De esta forma, se crea un “sandwich” de ácidos nucleicos. La matriz se lava para eliminar todo aquello que no ha quedado retenido. Se aplica plata coloidal que aumenta los tamaños de las esferas para que favorecer la sensibilidad de la detección. (B) Sondas de captura específicas, junto a controles internos, son colocados por triplicado en diferentes lugares del portaobjetos para asegurar la consistencia en los pasos del anillamiento e hibridación y aumentar la precisión de los resultados. La detección de la secuencia diana se lleva a cabo usando una fuente de luz que cruce el plano del array. Si están presentes, las microsferas de plata unidas difractarán la luz, que será detectada por una cámara óptica en el lector. Sacada de Buchan & Ledebøer (2014)



Un ejemplo de la tecnología de microarrays en fase líquida es el sistema xTAG (Luminex, Toronto, Canadá), que se ilustra en la Figura 14. 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.

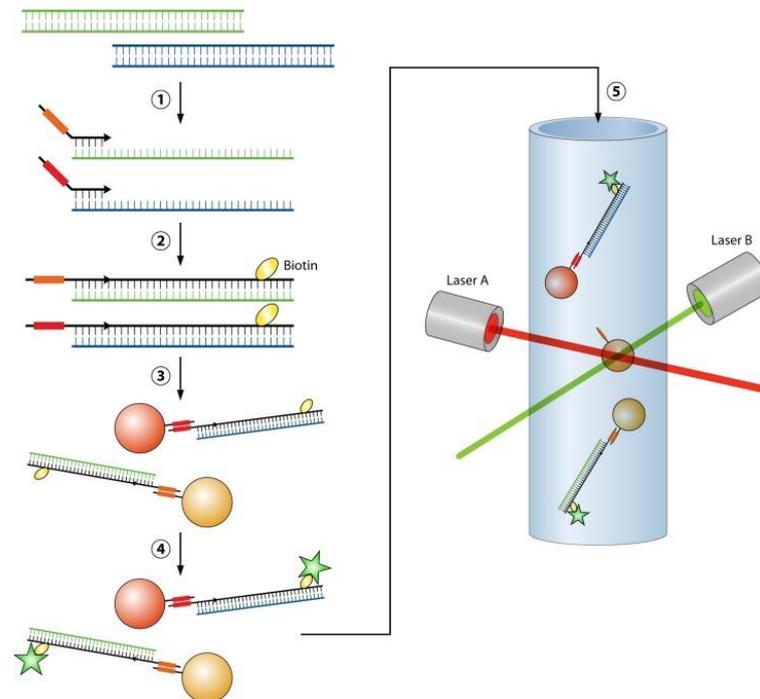


Figura 14. Microarrays en fase líquida xTAG. Las secuencias diana (verde y azul) se amplifican mediante PCR multiplex. Tras la amplificación, un segundo conjunto de cebadores específicos contra la diana es usado para extender la copia de la secuencia diana. Estos contienen secuencias de etiqueta “universal” (recuadros naranja y rojo) únicos para cada primer. Durante dicha extensión, se incorpora un marcador de biotina en el amplicón. Los amplicones marcados, se incuban entonces con microperlas de poliestireno. Cada microperla tiene un color único, lo que permite la diferenciación de hasta 100 tipos diferentes por el analizador. Cada perla está recubierta con una sonda nucleotídica de cadena sencilla complementaria a una de las etiquetas de secuencias universales (antitag). Los amplicones etiquetados con una etiqueta de secuencia universal podrán hibridar con una microperla que contenga su antitag. Además, un fluorocromo conjugado con estreptavidina (estrella verde) se añade e hibrida con los amplicones unidos a biotina que están inmovilizados en las perlas. Siguiendo los pasos de la hibridación, las perlas son analizadas utilizando un cell sorter (citometría de flujo) equipado con 2 láseres. El primero detecta la presencia del fluoróforo conjugado con biotina, que indica la presencia de un amplicón unido a su microperla específica. El segundo láser se centra en la perla para determinar qué color está presente y de esta manera identificar la diana específica en el amplicón. En el ejemplo del paso 5, se puede ver como la perla central no está unida a un amplicón, por tanto, no será reconocida por el primer láser y entonces, no será analizada tampoco por el segundo. Sacada de Buchan & Ledebor (2014)

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.

5.1.3. PCR digital.

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

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

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

Estos problemas desaparecen con la técnica PCR digital (**dPCR**). Esta técnica está diseñada para determinar el número real de secuencias blanco presentes en una muestra clínica. Esto se consigue mediante la dilución y segregación de la muestra en miles de mezclas de RT-PCR. La dilución de la muestra es tal que cada mezcla de reacción tendrá una o ninguna copia del molde. Siguiendo la RT-PCR de todas las mezclas, el número de pocillos donde se detecte una señal positiva corresponde al número de copias del molde que estaban presentes en la muestra (Fig. 15).

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

Un segundo método se basa en la emulsión de los componentes de la PCR, la muestra y un aceite, que, a continuación, va a ser dividido en 10 millones de gotitas de un volumen de picolitro

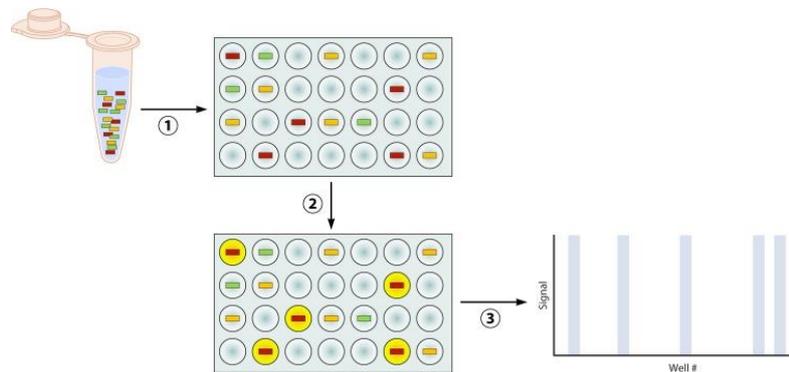


Figura 15. PCR digital. Un molde de ácido nucleico que contiene una secuencia diana (cajas de colores) en la muestra original es diluida en pequeños pocillos (microwells; placa de PCR) o gotas de picolitros (emulsión PCR) de tal manera que cada pocillo o gota contiene 1 o 0 copias de la secuencia diana. Después, se lleva a cabo una PCR de punto final (end-point PCR) y se detecta la presencia de amplicón utilizando colorantes o sondas fluorescentes. Cada pocillo será o positivo o negativo para la señal fluorescente dependiendo de la presencia de la secuencia diana y el amplicón resultante (los círculos amarillos corresponden a las barras azules del gráfico). El número de pocillos o gotas positivas para la señal fluorescente (círculos amarillos) corresponde directamente al número de secuencias diana específicas (cajas rojas) que se encuentren en la muestra original. Sacada de Buchan & Ledebor (2014)

(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.

5.1.4. 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.

5.1.5. 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 (Fig 16).

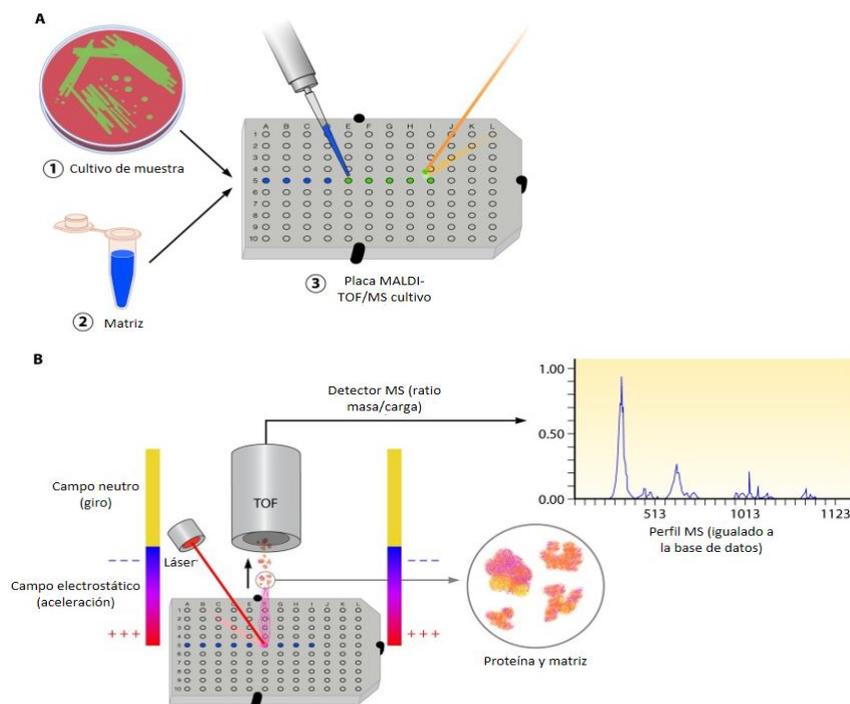


Figura 16. Espectrometría MALDI-TOF. (A) La preparación de muestras para análisis con espectrometría de masas MALDI-TOF puede ser por transferencia directa de una colonia bacteriana a la placa muestra utilizando una herramienta estéril (puntos verdes) o como un líquido sobrenadante tras un procedimiento de extracción (puntos azules). En cualquiera de los métodos, el analito puede secarse antes de ser cubierto por una matriz ácida débil. (B) Comienza el análisis con la exposición de la muestra al láser, que ioniza y desabsorbe al analito de la placa de muestra. Los iones creados son acelerados a través del tubo de vacío de tiempo de vuelo por aplicación de un campo electrostático hasta que alcanzan el detector MS. Los iones con un ratio alto de masa/carga tardarán más en el tiempo de vuelo que aquellos con pequeños ratios. Un perfil MS es creado con el ratio masa/carga de cada especie de ion sobre el eje x y la abundancia relativa de esa especie en el eje y. El perfil MS es comparado con una librería de referencia de espectros ya definidos para establecer la mejor coincidencia con el aislado que se está analizando. Modificada a partir de la figura en Bachun & 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. 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 ve sometida 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%.

6. Antibióticos.

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

El descubrimiento del primer antibiótico se atribuye al científico británico **Alexander Fleming**.

En su laboratorio cultivaban colonias de *Staphylococcus aureus* para sus experimentos y, un día, cuando iba a tirar ciertas placas Petri, observó cómo un hongo había salido en una de ellas a modo de contaminante de manera espontánea. Dejó esa placa apartada y, al observarla días después, vio cómo había una zona transparente alrededor del hongo (que más tarde sería descrito como *Penicillium notatum*) debida a la lisis bacteriana (Fig. 17).

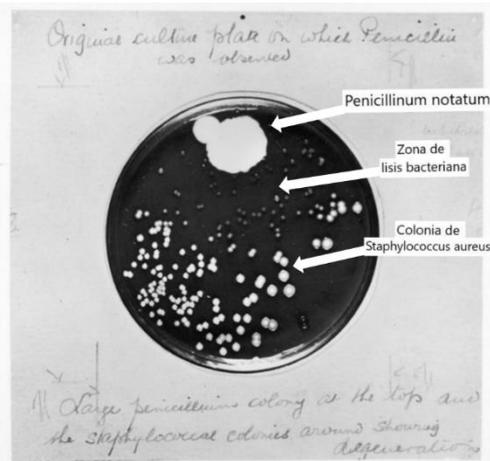


Figura 17. Placa de Petri original de Alexander Fleming. Se puede observar cómo en la zona próxima al crecimiento del hongo *Penicillium notatum* se produce la lisis de las colonias bacterianas de *Staphylococcus aureus*, mientras que fuera del área de influencia del hongo sí se permite el crecimiento de colonias. Modificada a partir de figura disponible en el enlace de internet <https://www.historychannel.com.au/articles/penicillin-is-discovered/>

Así, se supo que había algún principio producido por los hongos capaz de acabar con las bacterias, pero no supo demostrar cuál. No fue hasta la década de 1940 cuando Howard Florey y Ernst Chain descubrieron el principio activo de la penicilina y desarrollaron la forma en polvo del mismo para poder usarlo como medicina.

Sin embargo, se está empezando a tener constancia de que 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" **resistentes a los antibióticos** que no pueden ser controlados por ellos.

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.

El grave problema de las resistencias a drogas es debido en gran parte al mal uso que de los antibióticos se hace. Así, se estima que alrededor del 50% de las prescripciones de antibióticos son dados sin una evidencia clara de infección o sin una indicación médica adecuada. Por ejemplo, en muchos casos se administran drogas antibacterianas a pacientes con gripe, neumonía viral 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.

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

La utilización de antibióticos en los alimentos para animales es indudablemente otro factor que contribuye a aumentar el problema de resistencia a drogas. La adición de bajos niveles de antibióticos a estos alimentos favorece un mejor rendimiento en la producción, como consecuencia de disminuir las infecciones que normalmente se producen en granjas donde los animales están muy hacinados (vacas, cerdos, pollos y peces). Así, las cantidades de antibióticos utilizados para la salud animal son enormes si se compara con el consumo en humanos. Esta práctica conduce a un aumento en el número de bacterias resistentes en estos animales. 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 contaminación ambiental procedente de fábricas de producción de antibióticos. Así, una fracción importante de los antibióticos (entre el 20-80%, dependiendo del tipo) terminan liberados, en forma químicamente activa, al ambiente, contaminando ríos, lagos, suelos y productos alimentarios (leche, carnes y verduras). Estos antibióticos, en cantidades subclínicas, van a ejercer sus efectos sobre las bacterias, favoreciendo el desarrollo de cepas resistentes (Fig. 18).

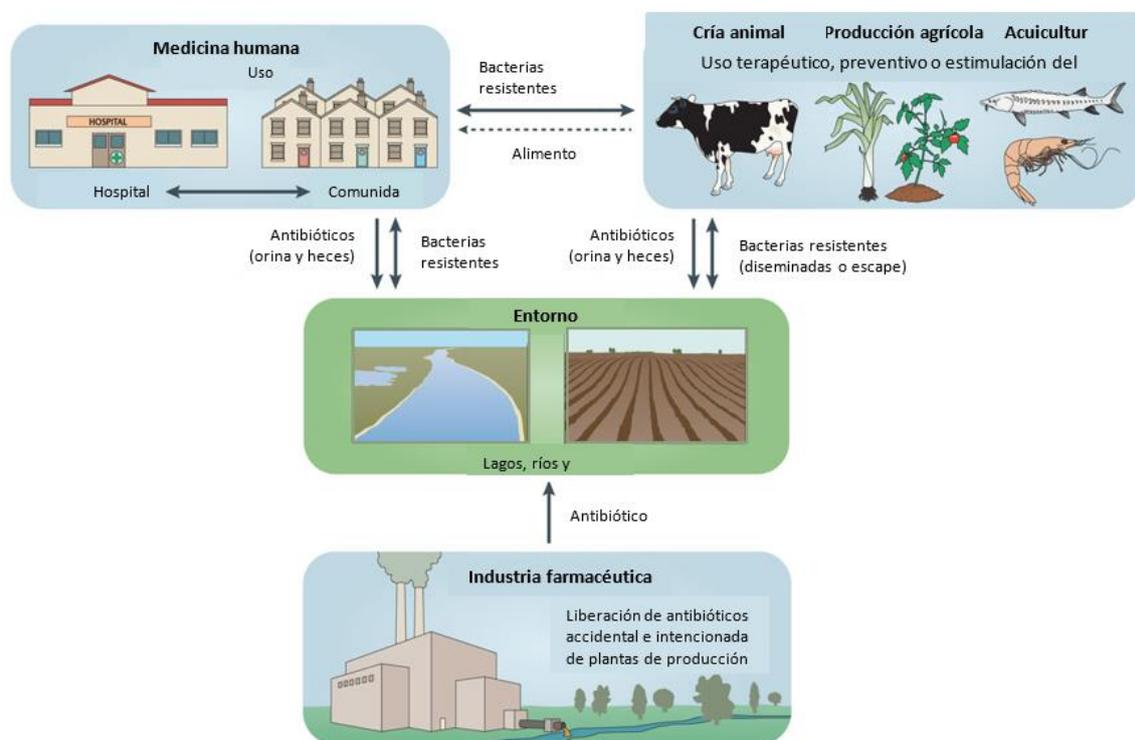


Figura 18. Ecología de los antibióticos y resistencia. Los antibióticos son producidos por bacterias y hongos desde hace millones de años. Además, durante los últimos 70 años aproximadamente, los humanos hemos producido y acumulado grandes cantidades de agentes antimicrobianos, bien con fines medicinales, 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. Modificada a partir de figura en Andersson & Hughes (2014)

6.1. 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 inhibitoras.

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

Si bien los antibióticos tienen como blanco a organismos patogénicos, diversos microorganismos del microbiota van a resultar afectados, con lo que se va a producir una alteración de las poblaciones del intestino, que va a requerir de mucho tiempo para reestablecer el equilibrio una vez que cese el tratamiento con antibióticos.

Así, **disbiosis** es un término frecuentemente utilizado para referirse al efecto de los tratamientos antibióticos sobre el organismo, ya que hace referencia a un desbalance en la estructura microbiana de nuestro microbiota, que conduce a una ratio anormal de especies bacterianas comensales y patogénicas. Para corregir estos desbalances, con frecuencia se recurre al uso de probióticos y prebióticos. Los **probióticos** se definen como microorganismos vivos que se administran con el objetivo de mejorar el balance de microorganismos que conforman la flora intestinal; los principales microorganismos utilizados como probióticos son bacterias productoras de ácido láctico de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los **prebióticos** son ingredientes alimentarios destinados a cambiar la composición y actividad de la flora intestinal del colon. Estos son fundamentalmente carbohidratos no hidrolizables por las enzimas gástricas y polifenoles, que sí van a poder ser utilizados por las bacterias presentes en el colon (lactobacilos y bifidobacterias), que a su vez van a producir metabolitos beneficiosos para otros microorganismos de la flora intestinal y también para los colonocitos, lo que resulta en un mejor funcionamiento del tejido intestinal.

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 adversos de los antibióticos sobre el microbiota intestinal** y la inmunidad de las mucosas no se limitan a los de los antibióticos administrados por vía oral, sino que los antibióticos inoculados por vía sistémica también van a tener impacto sobre el microbiota intestinal, ya que pueden llegar al intestino a través del sistema biliar.

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

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.

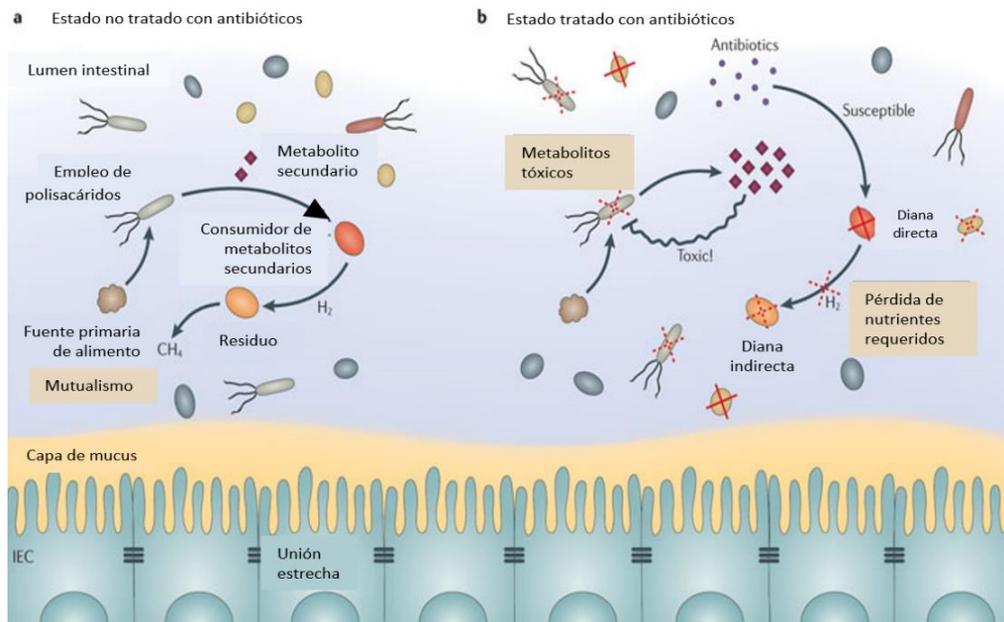


Figura 19. Los antibióticos tienen efectos directos e indirectos sobre la microbiota intestinal. (a) Mutualismo existente entre los simbiontes intestinales y las células del huésped en ausencia del antibiótico, y alteración del mismo en presencia de un antibiótico. Un polisacárido presente en los alimentos ingeridos puede ser utilizado como fuente de energía para producir una serie de metabolitos secundarios que, a su vez, serán empleados por otras especies simbióticas vecinas y que producirán sustancias deshecho, 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 para el propio microorganismo, como también la escasez de nutrientes para las bacterias competentes en eliminar los productos de deshecho. Modificada a partir de figura en Willing et al (2011)

Como se ilustra en la Figura 19, los antibióticos tienen efectos directos e indirectos sobre el microbiota intestinal. Existen relaciones de mutualismo entre los microorganismos del intestino y el hospedador, dándose co-dependencia metabólica en muchos casos. Por ejemplo, como se ilustra en la figura, un microorganismo capaz de utilizar polisacáridos adquiere estos nutrientes del alimento ingerido por el hospedador, 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 H₂, 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 mismos. 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.

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 está además implicado en la regulación de muchos aspectos de la inmunidad intestinal.

Por otro lado, los antibióticos de forma indirecta van a afectar al **sistema inmunitario**.

Un mecanismo importante por el que el microbiota afecta al sistema inmunitario del hospedador es a través de la activación de los receptores que reconocen los MAMPs (*“Microorganism-Associated Molecular Patterns”*), tales como los TLRs (*“Toll-like Receptors”*) y los NLRs (*“NOD-like Receptors”*). Estos PRRs (*“Pattern Recognition Receptors”*) son activados por diversos ligandos presentes en los microorganismos intestinales, entre los que se incluyen el lipolisacárido (LPS), los ácidos lipoteicoicos (LTA), la flagelina, secuencias CpG del DNA y el peptidoglicano.

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

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

La Figura 20 ilustra cómo los antibióticos inciden sobre la **homeostasis** epitelial en el intestino y aumentan la susceptibilidad del hospedador a los patógenos invasores. Los PRRs que reconocen a los MAMPs procedentes 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. La IgA y los AMPs secretados son importantes para controlar a las poblaciones bacterianas y mantener la homeostasis del epitelio intestinal. Las uniones estrechas y la capa gruesa de mucus impiden a los patógenos dañar la barrera intestinal. Como consecuencia del tratamiento con antibióticos se va a producir una alteración de la homeostasis intestinal. Grupos de la microbiota normal son eliminados, lo que conlleva una disminución en los MAMPs que son expuestos a las células epiteliales y, como consecuencia, a una menor señalización a través de los PRRs, lo que se manifiesta en una producción disminuida de AMPs. La baja producción de AMPs y la alteración de la barrera epitelial facilita la invasión por parte de patógenos entéricos.

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

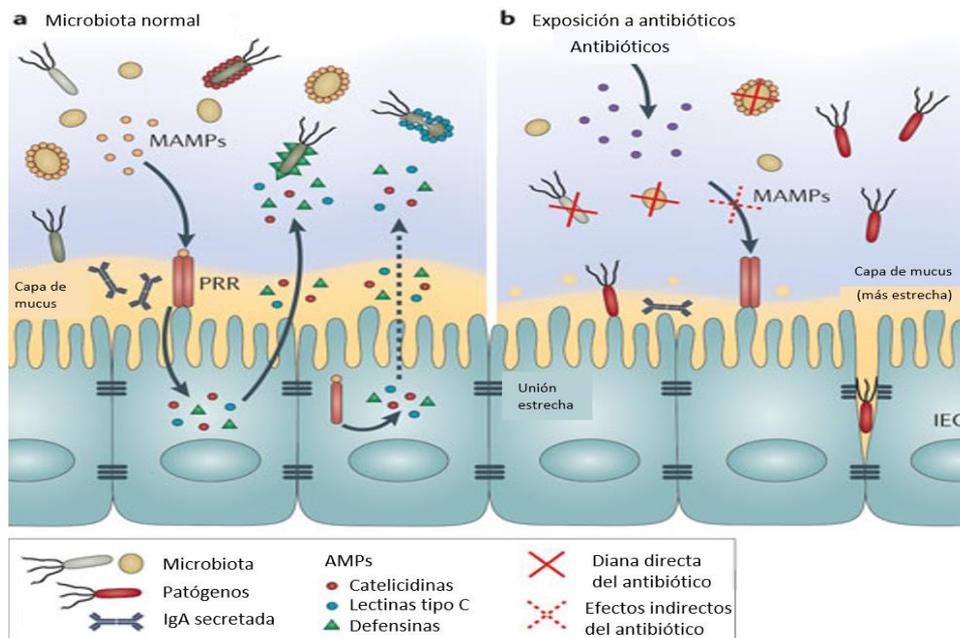


Figura 20. Los antibióticos alteran la homeostasis del epitelio intestinal y aumentan la susceptibilidad a patógenos del hospedador. (a) En ausencia de antibióticos, existe una homeostasis epitelial. Moléculas asociadas a microorganismos (MAMPs) son reconocidas por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) intracelulares y extracelulares, lo que estimula la 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 existe 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. Modificada a partir de figura en Willing et al (2011)

6.2. Características generales de los antibióticos.

La mayoría de los antibióticos descubiertos durante los pasados 60-70 años se han descubierto a través de la búsqueda en muestras del suelo de productos naturales que mataran bacterias, incluidos patógenos conocidos; primero sobre placas de cultivo y después en infecciones animales. El periodo 1945-60 se considera la “era dorada” de los antibióticos, pues fue entonces cuando la mayoría de las clases químicas de antibióticos, actualmente en uso, fueron descubiertos. Entre estos se incluyen las penicilinas y cefalosporinas de hongos, y diferentes antibióticos de la bacteria filamentosa *Streptomyces* como son la estreptomycinina, la eritromicina, la tetraciclina y la vancomicina.

Durante el periodo 1970-80 se llevaron a cabo modificaciones químicas sobre las estructuras básicas de los antibióticos conocidos hasta el momento 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. Sin embargo, hasta ahora, solo los fluoroquinolones (por ejemplo, la ciprofloxacina) constituyen una clase significativa de antibióticos que son totalmente sintéticos.

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

6.3. Blancos para las principales clases de drogas antibacterianas.

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

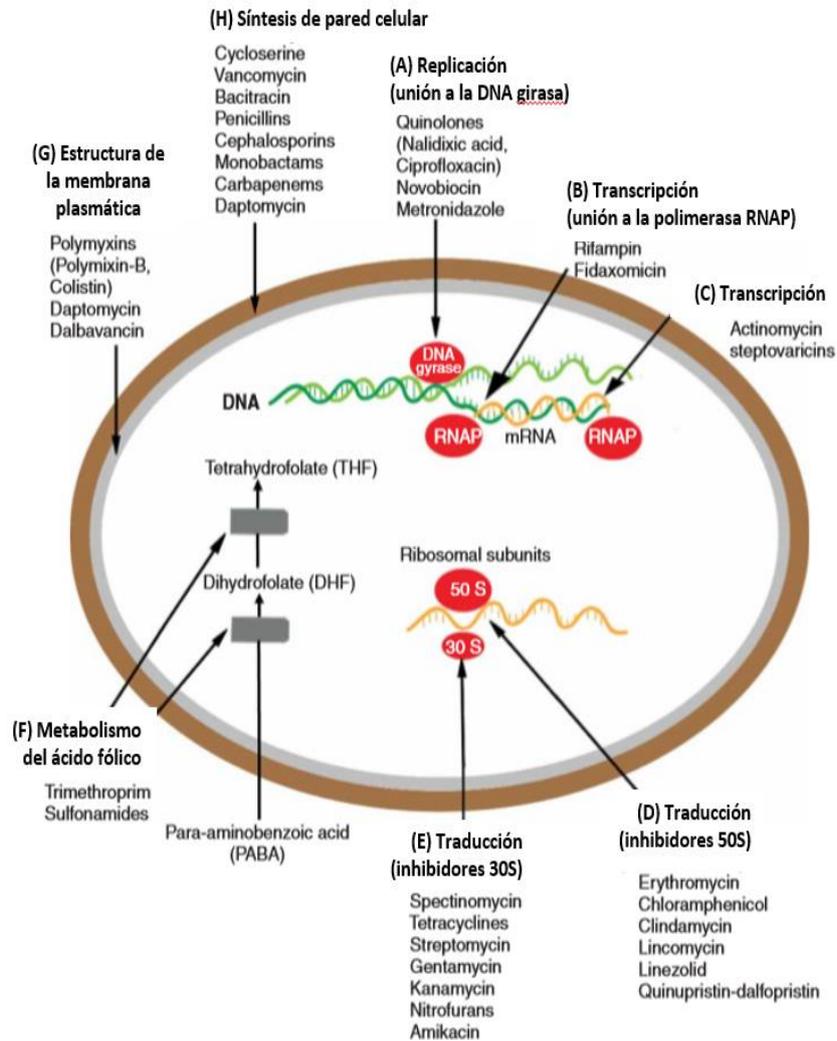


Figura 21. Mecanismos de acción de diferentes familias de antibióticos. (A) Antibióticos que inhiben la síntesis bacteriana de DNA uniéndose a la enzima DNA girasa, inhibiendo su acción. (B) El inicio de la transcripción del RNA se inhibe por rifampina, que se une a RNAP. (C) Antibióticos que bloquean la elongación. (D) Antibióticos que se unen a la subunidad 50S y, por tanto, inhiben la síntesis de proteínas. (E) Antibióticos que se unen a la subunidad 30S y, por tanto, inhiben la síntesis proteica. (F) El metabolismo del ácido fólico puede inhibirse por la acción de antibióticos. (G) La membrana celular puede alterarse por los antibióticos. (H) La síntesis de la pared celular puede inhibirse por la acción de antibióticos. Modificada a partir de figura en Penchovsky y Traykovska. (2015)

6.3.1. Biosíntesis de la pared celular.

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

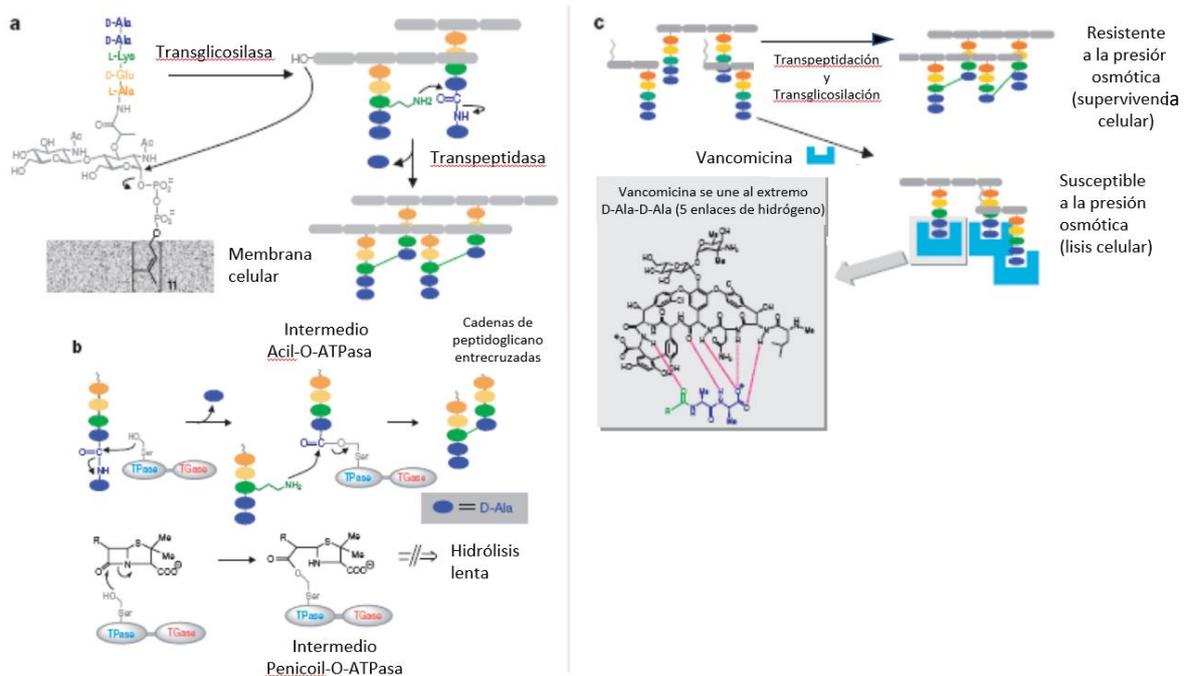


Figura 22. Bloqueo de los pasos de transpeptidación y transglucosilación de la biosíntesis de pared celular por penicilinas y vancomicinas. (a) Interrupción del normal entrecruzamiento y de las enzimas que aportan resistencia a la pared por antibióticos que inhiben a la enzima (penicilina) o secuestran su sustrato (vancomicina). (b) Inhibición de la actividad transpeptidasa por penicilinas a través de la formación de un intermedio covalente acil-enzima de lenta hidrólisis. (c) Acoplamiento de la vancomicina a los dímeros D-Ala-D-Ala terminales del peptidoglicano mediante el establecimiento de cinco puentes de hidrógeno. Modificada a partir de figura en Walsh et al. (2000)

Las transglucosilasas 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-acetylmuramyl-pentapeptide-pyrophosphoryl-undecaprenol (lipid II).

Las enzimas bifuncionales que contienen tanto el dominio transpeptidasa como el dominio transglucosilasa, que participan en la síntesis del peptidoglicano, son el blanco de acción de las penicilinas y cefalosporinas, que contienen el grupo β -lactámico y que actúan como pseudosustratos; acetilando los sitios activos de las transpeptidasas (también llamadas proteínas de unión a penicilina o PBPs; Fig. 22B). Los sitios activos de estas enzimas se desacilan muy lentamente, lo que impide su acción normal de hacer cruzamientos de las cadenas peptídicas en la capa de peptidoglicano, lo que conduce a una debilidad mecánica de la pared bacteriana y a una mayor susceptibilidad a la lisis por cambios de presión osmótica.

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

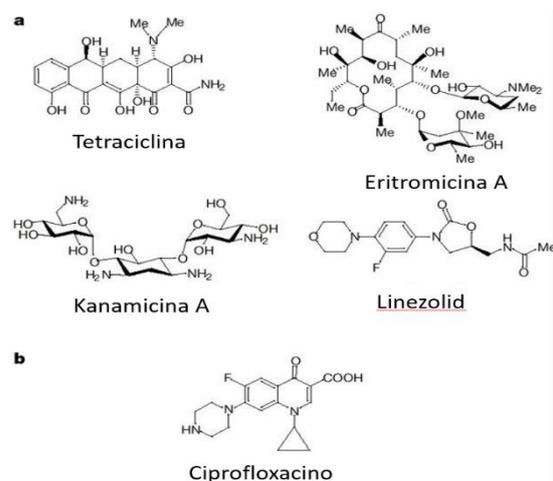
Dado que los β -lactámicos y la vancomicina actúan en etapas adyacentes –sustrato y enzima– actúan sinérgicamente cuando se emplean en combinación.

6.3.2. Síntesis de proteínas.

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

Sus estructuras químicas se muestran en la Figura 23.

Figura 23. Diversidad estructural y funcional de fármacos antibacterianos. (a) Macrólidos de la clase eritromicina, tetraciclinas, aminoglicósidos (representados por kanamicina) y linezolid oxazolidinona (sintético). Estos compuestos afectan al rRNA de 23S y a las proteínas asociadas en el centro peptidil transferasa del ribosoma para inhibir distintos pasos de la elongación de la cadena proteica. (b) Los fluoroquinolones (representados por ciprofloxacino) matan a las bacterias inhibiendo a la DNA girasa y topoisomerasa IV en mitad de su ciclo catalítico atrapándolas en el intermedio que forman con el DNA con rotura de doble hebra sobre el que actúan. Modificada a partir de figura en Walsh (2000)



Como ejemplo de su mecanismo de acción podemos destacar a la kanamicina anteriormente mencionada. La kanamicina se une de manera irreversible a las proteínas ribosómicas de la subunidad 30S y al rRNA de 16S de los ribosomas bacterianos por secuencias específicas. Esto interfiere con la capacidad flotante de la tercera base del anticodón del tRNA, lo que interfiere con la formación del complejo de iniciación de la traducción, provocando una mala lectura del mRNA, que incorpora aminoácidos erróneos dando lugar a proteínas aberrantes y tóxicas para la bacteria. Además, provoca con su interacción con las proteínas ribosómicas una ruptura de los polisomas (ribosomas encadenados que traducen seriadamente los mRNAs) hacia monosomas no funcionales; provocando la muerte de la bacteria (Fig. 24).

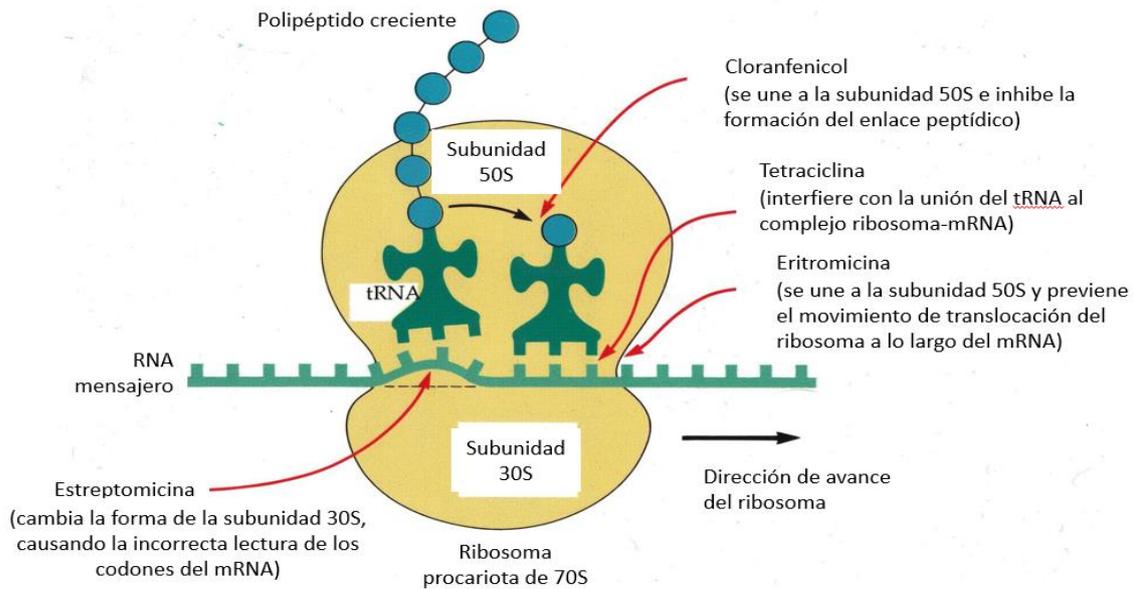


Figura 24. **Mecanismos de actuación de varios antibióticos sobre el proceso de traducción.** Figura adaptada de la página web pixelloaddxm7.tk

6.3.3. Replicación y reparación del DNA.

Los fluoroquinolones, tales como la ciprofloxacina matan las bacterias a través de inactivar el enzima DNA girasa; enzima responsable de relajar los superenrollamientos de DNA bacteriano de doble cadena que se obtienen después de cada ronda de replicación de DNA. Las DNA girasas son topoisomerasas tipo II y provoca la rotura transitoria de las dos hebras de DNA anclándose reversiblemente 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 para que gire una hebra en torno a la otra y se desenrolle el superenrollamiento. La ciprofloxacina forma un complejo con el enzima y el DNA roto, lo 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 de la bacteria.

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

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

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

Dado el gran número de bacterias que se dan en un ciclo infeccioso, 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.

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.

6.4.1. Bombeo hacia fuera de antibióticos.

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

Según se ilustra en la Figura 25A, el fármaco es expulsado al exterior de una forma más rápida de lo que puede difundir hacia el interior, de esta forma las concentraciones dentro de la bacteria se mantienen bajas e inefectivas.

Las **bombas de eflujo** de antibióticos pueden clasificarse en seis familias atendiendo a la fuente de energía que utilizan, su número de componentes estructurales o la naturaleza del compuesto bombeado: la superfamilia ABC (*ATP-Binding Cassette*), superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*), familia MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*), familia SMR (*Small Multidrug Resistance*), superfamilia RND (*Resistance-Nodulation-Division*) y la superfamilia DMT (*Drug Metabolite Transporter*) como quedan ilustradas en la Figura 26.

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

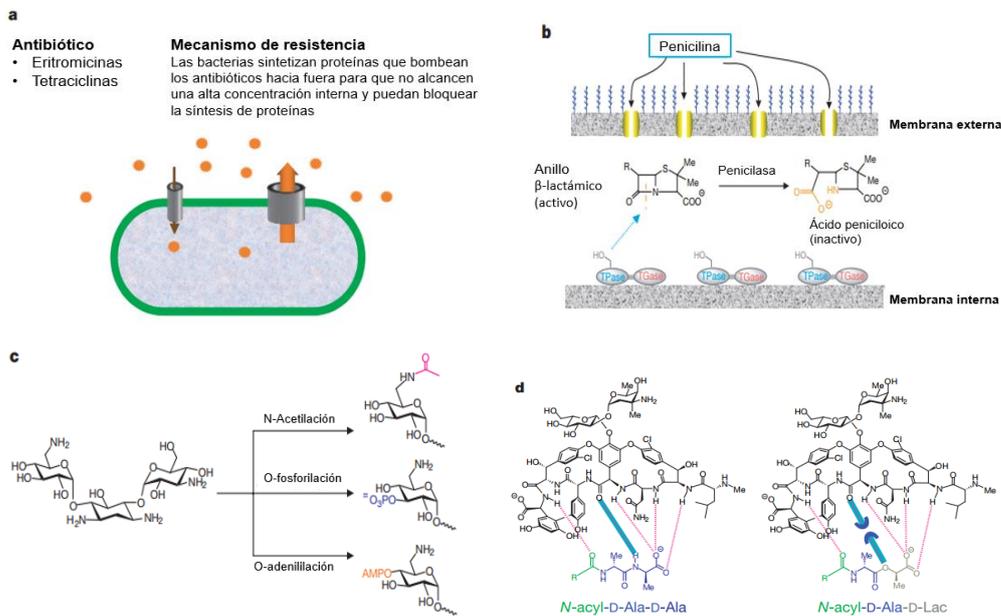


Figura 25. Estrategias principales de resistencia para la supervivencia bacteriana. (A) Fármacos, tales como tetraciclinas o eritromicinas, son devueltas al exterior de la bacteria gracias a la acción de bombas de eflujo, con el fin de mantener la concentración intracelular del fármaco por debajo de su nivel terapéutico. **(B)** A veces, el antibiótico es destruido por modificación química de su estructura debido a una enzima que es sintetizada por la bacteria resistente. En la figura se ilustra cómo la β -lactamasa es secretada al espacio periplásmico para hidrolizar las moléculas de penicilina antes de que alcancen su blanco molecular (PBPs) en la membrana de las bacterias Gram-negativas. **(C)** El antibiótico aminoglicósido kanamicina puede ser modificado enzimáticamente en tres localizaciones diferentes por tres actividades enzimáticas distintas: N-acetilación, O-fosforilación y O-adenilación, con el fin de bloquear su interacción con su diana molecular en el ribosoma. **(D)** Además, la estructura de la diana bacteriana puede ser reprogramada para disminuir su afinidad por la molécula de antibiótico. Esta imagen muestra el cambio de un enlace amida en el D-Ala-D-Ala terminal del peptidoglicano por un enlace éster en el nuevo D-Ala-D-Lac terminal, lo que va acompañado con una reducción de 1000 veces en la afinidad de reconocimiento del antibiótico. (Modificada a partir de la figura en Walsh, 2000).

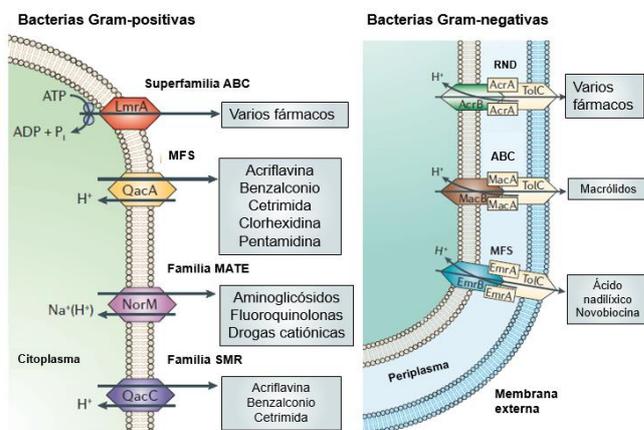


Figura 26. Bombas de eflujo de resistencia múltiple. La imagen ilustra las cinco familias de bombas de eflujo de resistencia a múltiples fármacos, junto con un diagrama de su estructura y su localización en la membrana de bacterias Gram-positivas (izquierda) o Gram-negativas (derecha). Para cada una, quedan recogidos ejemplos de antibióticos para los que generan resistencia. Cabe destacar el sistema AcrAB-ToIC de la superfamilia de transportadores tipo ABC en bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* que generan resistencia a macrólidos. (Modificado de Piddock, 2006).

6.4.2. Destrucción del antibiótico.

El ejemplo clásico es la desactivación por hidrólisis del anillo β -lactámico en las penicilinas y cefalosporinas a través de la elaboración del enzima **β -lactamasa** por la bacteria resistente fue probablemente el primer mecanismo de resistencia descrito en la literatura científica. Dado que es el anillo β -lactámico la parte funcional, su rotura rinde un producto inactivo que no interacciona con las PBPs. Tal como aparece en la Figura 25B, las bacterias que producen β -lactamasa secretan la enzima al periplasma para destruir los antibióticos β -lactámicos 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.

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

Otras clases de antibióticos, como los aminoglicósidos, son neutralizados por enzimas desactivantes que modifican su estructura a través de la adición de tres tipos de **sustituyentes químicos**, lo que hace que estos compuestos ya no sean activos en su interacción con el RNA del ribosoma. Como se muestra en la Figura 25C, 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.

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

6.4.3. 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.

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 es elegante e implica a un sistema regulador con dos componentes, VanR y VanS, y cuatro enzimas VanH, VanA, VanX y VanY (Fig. 27). Todos ellos forman el denominado **operón VanHAX** del transposón Tn1546. La presencia de glicopéptidos conduce a la activación de VanS, que se autofosforila, y fosforila a su vez a VanR. Una vez fosforilada la proteína VanR, esta va a aumentar la transcripción de los genes VanH, VanA, VanX y VanY. VanH es una 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.

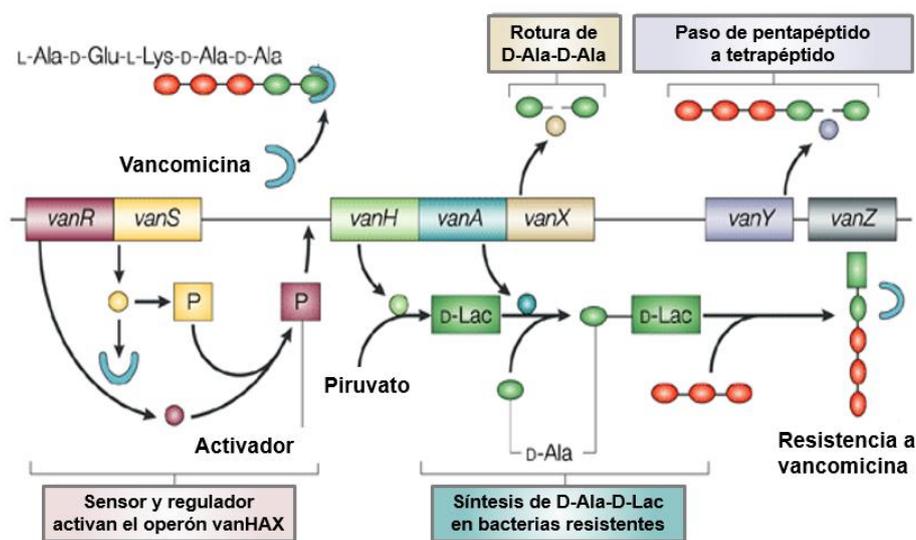


Figura 27. El operón VanHAX confiere resistencia a vancomicina. El sistema regulador formado por los componentes VanR y VanS regula la resistencia a vancomicina característica de enterococos (*vancomycin-resistant enterococci*, VRE) y cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (VRSA). VanS es un sensor de membrana de dicho antibiótico que controla los niveles de fosforilación de VanR. VanR es un factor de transcripción que activa el operón formado por VanH, VanA y VanX. VanH es una deshidrogenasa que reduce el piruvato a D-lactato; VanA es una ligasa que cataliza la formación del enlace éster entre D-Alanina y el D-lactato formado de tal forma que no pueda unirse la vancomicina al extremo terminal del peptidoglicano. VanX es una dipeptidasa que hidroliza el componente fisiológico D-Ala-D-Ala. Por último, VanY es una carboxipeptidasa que hidroliza el residuo terminal D-Ala de precursores de peptidoglicano generados si la actividad de VanX no ha sido completa. Así, D-Ala-D-Lac reemplaza el dipéptido normal D-Ala-D-Ala en la síntesis del peptidoglicano resultando en la resistencia. (Modificada a partir de la figura en Hughes, 2003).

Por otro lado, VanX es una dipeptidasa dependiente de Zn^{2+} , altamente específica, que destruye la reserva celular de D-Ala-D-Ala. Finalmente, VanY hidroliza la D-Alanina terminal presente en las unidades pentapépticas normales. Como resultado, el peptidoglicano de las células resistentes a vancomicina incorpora el éster D-Ala-D-Lactato en lugar del péptido D-Ala-D-Ala (Fig. 25D). 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.

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

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

6.5. Desarrollo de nuevas drogas que eviten la resistencia.

El conocimiento de los mecanismos de resistencia provee de nuevas perspectivas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Históricamente, cuando la resistencia a los antibióticos con anillo β -lactámico apareció, los médicos jugaron con la periferia de dicho anillo 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 (*Streptomyces clavuligerus*), que no siendo propiamente un antibiótico si es un sustrato suicida para las lactamasas. Por tanto, la presencia del clavulanato permite a la droga clásica amoxicilina (con anillo β -lactamo) tener un mayor rango antibacteriano. La combinación de clavulanato y amoxicilina se llama augmentine (Fig. 28A) y constituye una terapia de primera línea, que se viene utilizando desde hace unos 30 años; desgraciadamente, ya se han detectado algunas cepas bacterianas resistentes. Existen otras combinaciones de inhibidores de β -lactamasas y antibióticos β -lactámicos también ampliamente utilizadas: Unasyn, Timentin, Zocin y Avycaz, que utilizan otras combinaciones de antibióticos e inhibidores de β -lactamasas.

Siguiendo la misma lógica se han buscado o diseñado análogos de tetraciclinas y eritromicinas que son **menos susceptibles** de ser expulsadas por las bombas **de eflujo**. Por ejemplo, en la Figura 28B se muestra una forma de eritromicinas, de tercera generación que, además, es menos propensa a inducir la resistencia por metilación debido a la acción de Erm.

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

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

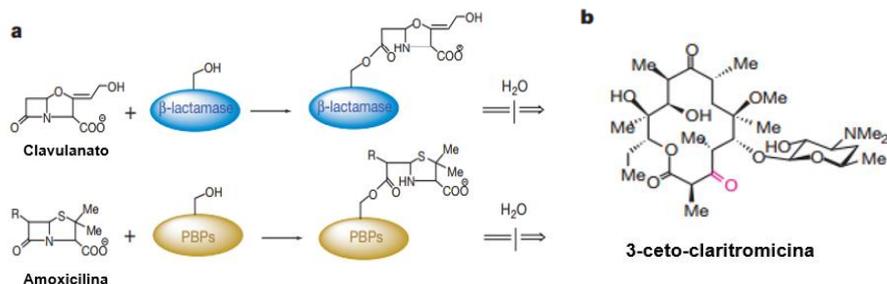


Figura 28. Nuevas estrategias en el diseño de fármacos contra la resistencia bacteriana.

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

Así, por ejemplo, la **loperamida** (Fig. 29) se ha visto que actúa disminuyendo el potencial de membrana de las bacterias Gram-negativas. Para contrarrestar este efecto y mantener la síntesis de ATP, las bacterias aumentan el gradiente de protones de la membrana interna. El aumento en ΔpH , como consecuencia, produce un incremento en la entrada de tetraciclina, contrarrestando la resistencia intrínseca al antibiótico.

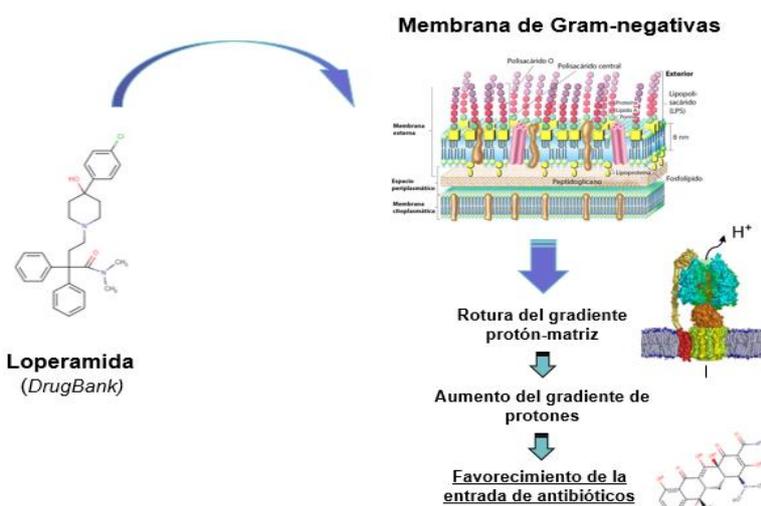


Figura 29. Acción de la loperamida en el bloqueo de resistencias bacterianas. Este compuesto interacciona con la membrana de las bacterias Gram-negativas y, como consecuencia, se rompe el gradiente protón-matriz que dirige la síntesis de ATP. Para reestablecer la síntesis de ATP, la bacteria aumenta su gradiente de protones lo que favorece la entrada de otros antibióticos como las tetraciclinas, como se muestra en la imagen.

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

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

6.6. Origen y evolución de los genes de resistencia.

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

Los estudios sobre estructura y función de las proteínas implicadas en resistencia muestran que éstas tienen características comunes con proteínas que no tienen la función de resistencia. Así, se piensa que las proteínas de resistencia han evolucionado a partir de precursores ancestrales que tenían **poca o nula afinidad** por los antibióticos. Además, hay que tener en cuenta que los antibióticos no existen sólo desde que se descubrieron (hace 60-70 años), sino que probablemente llevan estando en contacto con las poblaciones bacterianas durante millones de años. Por ejemplo, se han estimado que las rutas biosintéticas para eritromicina, estreptomina 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 como se ilustra en la Figura 30.

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

Un ejemplo bien caracterizado lo constituye la aminoglicósido quinasa (APH). Esta enzima está encargada de modificar al antibiótico estreptomina 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.

ORIGEN AMBIENTAL DE GENES DE RESISTENCIA

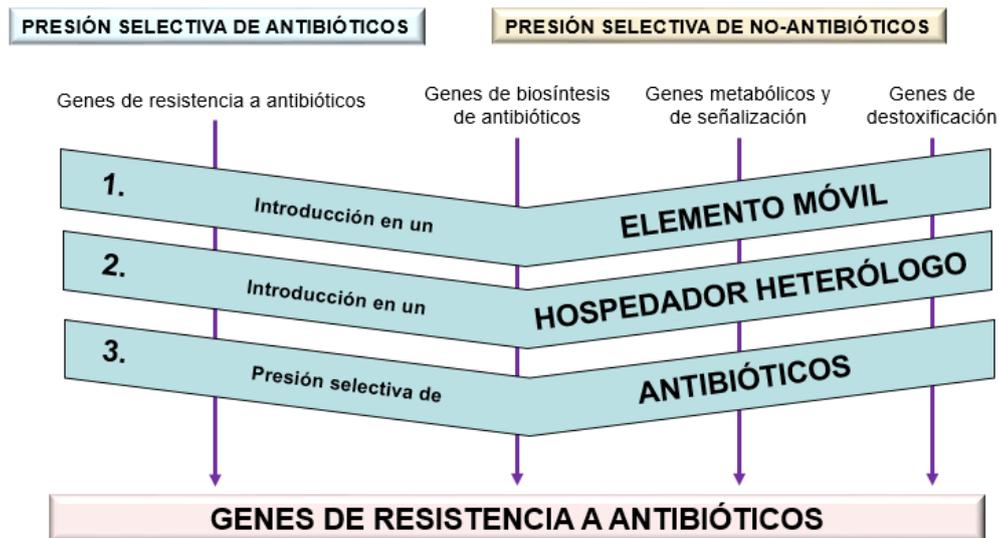


Figura 30. **Origen ambiental de genes de resistencia a antibióticos.** Los genes de resistencia a antibióticos pueden estar presentes en el medio ambiente perteneciendo a microorganismos productores y no productores de antibióticos. En los primeros, como mecanismo bona fide de protección y en los segundos como genes de rutas metabólicas y señalización que, tras un proceso de presión selectiva, han dado lugar a ellos.

6.7. Persistencia bacteriana como mecanismo de resistencia a antibióticos.

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

Precisamente la existencia de bacterias persistentes se puso de manifiesto en ensayos con antibióticos bactericidas. Así, cuando un cultivo bacteriano es expuesto a un antibiótico, se produce una rápida disminución en el conteo de bacterias como consecuencia de la muerte de la mayoría de la población, pero con frecuencia algunas de estas bacterias establecen el estado de persistencia, donde no son afectadas por el antibiótico, y serán capaces de generar una nueva población cuando se pongan en un medio carente de antibiótico (Fig. 31).

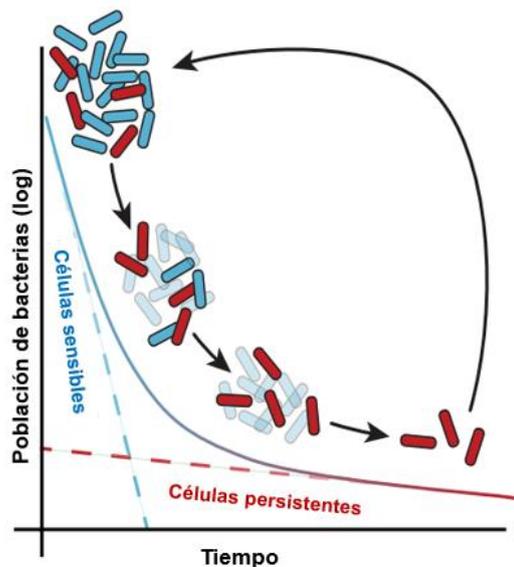


Figura 31. **Cinética bifásica de la muerte bacteriana tras el uso de un tratamiento bactericida.** La adición de una dosis letal de un antibiótico bactericida a tiempo 0 erradica de manera rápida la población bacteriana sensible a dicho fármaco (azul) hasta que únicamente persisten un pequeño porcentaje de bacterias persistentes (rojas) cuya muerte es más lenta. Al finalizar el tratamiento, la población de bacterias puede ser repuesta gracias a la reactivación de las bacterias persistentes remanentes en el medio. (Modificada a partir de la figura en Harms et al., 2016).

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

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

Entre las señales celulares que se han asociado al establecimiento de bacterias persistentes se encuentran la molécula de guanosina tetra- o pentafosfato – (p)ppGpp – conocida como **alarmona**, que normalmente se produce en respuesta a la falta de nutrientes y otros tipos de estrés. Así, por ejemplo, en *E. coli*, la síntesis de esta molécula (mediada por la proteína RelA) se activa por la falta de aminoácidos y por el choque térmico, mientras que la falta de carbono, nitrógeno, fosfato, hierro y ácidos grasos promueven la producción también de (p)ppGpp por la proteína SpoT. Estudios experimentales con diversas bacterias (tanto Gram-negativas como Gram-positivas), empleando mutantes incapaces de producir alarmona, han puesto de manifiesto que la falta de esta molécula conlleva una menor capacidad de establecer persistencia. La producción de (p)ppGpp también se estimula en determinadas condiciones ambientales como es en la fase estacionario de crecimiento o durante la formación de *biofilms* (Fig. 32). De hecho, se ha estimado que el número de bacterias persistentes es de 100 a 1000 veces mayor cuando una determinada bacteria se encuentra formando *biofilms* que cuando se encuentran creciendo de forma libre. Asimismo, los cultivos bacterianos en fase estacionaria presentan entre 1000 a 10000 veces más células persistentes que los cultivos en fase logarítmica. También los tratamientos de antibióticos a concentraciones subletales favorecen la aparición de bacterias persistentes.

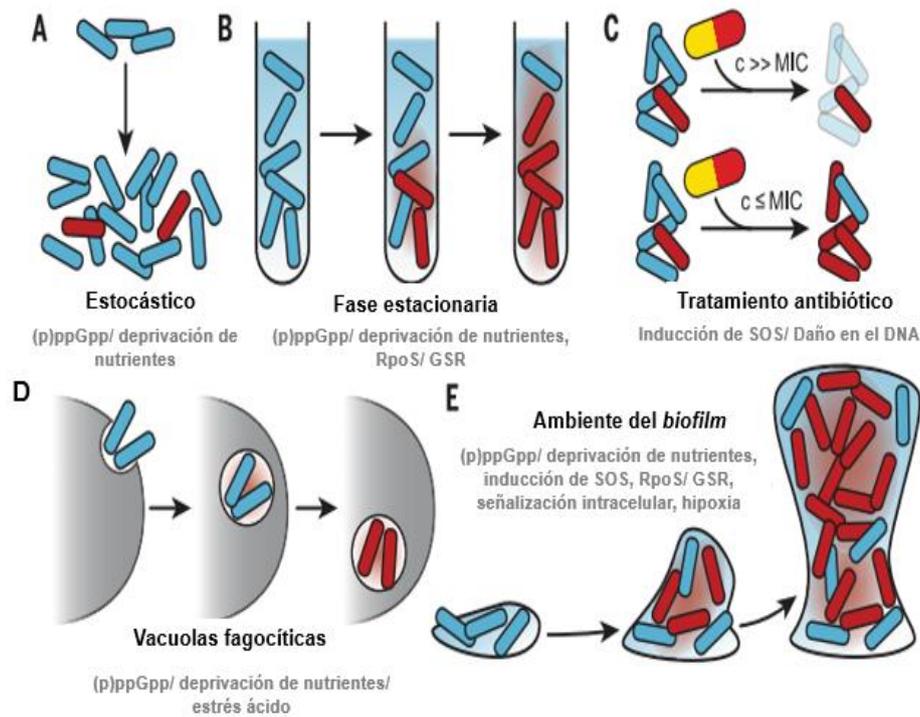


Figura 32. **Factores ambientales y señales celulares que subyacen al establecimiento de la resistencia bacteriana.** Más allá de la formación de persistencia de manera estocástica (A), existen diferentes factores ambientales que pueden activar dicho estado de persistencia (rojo) a partir de bacterias normales con capacidad de crecer (azules). Por ejemplo, dicha transición puede ser inducida en el estado estacionario (B), con la administración de un tratamiento antibiótico subletal (C), fagocitosis por células del sistema inmunitario (D), o la generación de biofilms (E). GSR (respuesta general al estrés), c (concentración), MIC (concentración mínima inhibitoria). (Modificada a partir de la figura de Harms et al., 2016).

Aparte de (p)ppGpp, otras moléculas y procesos se han implicado en la inducción de persistencia bacteriana. Entre otros está la respuesta general al estrés (a través de la vía del factor transcripcional RpoS), la inducción de la respuesta SOS, la hipoxia o el segundo mensajero di-GMP cíclico.

También se ha descrito fenómenos de comunicación bacteriana a través de la liberación de moléculas al medio que orquestan procesos de formación masiva de bacterias persistentes.

Otro grupo importante de mecanismos de activación de persistencia es mediado por los **sistemas toxina-antitoxina** bacterianos. Estos módulos toxina-antitoxina (TA) están formado por proteína toxina, que inhibe el crecimiento bacteriano al interferir con diversos procesos celulares esenciales, y por una molécula antitoxina, que impide la funcionalidad de la toxina. Existen múltiples tipos de módulos TA, aunque hasta el momento solo los tipos I y II se han implicado en el establecimiento del estado de persistencia. Las antitoxinas de los módulos TA de **tipo I** inhiben la expresión de la toxina actuando como RNAs antisentido, mientras que las antitoxinas de los módulos TA de **tipo II** son proteínas que inhiben a las toxinas mediante interacciones proteína-proteína. Las toxinas tipo I normalmente son proteínas pequeñas que forman poros en la membrana, lo que

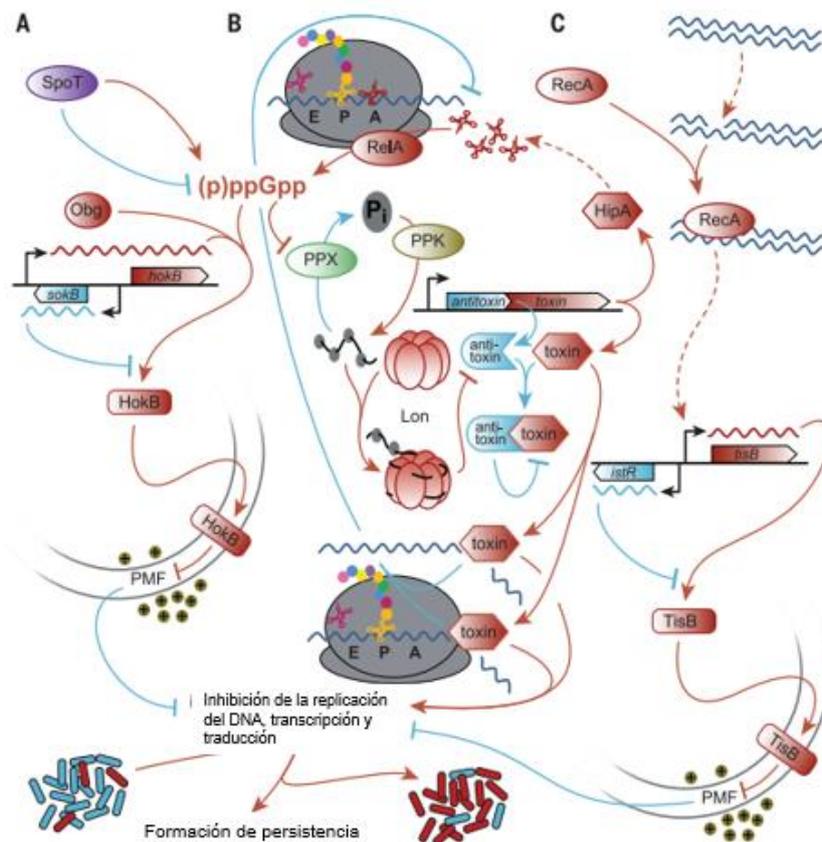


Figura 33. Mecanismos toxina-antitoxina y generación de persistencia en *E. coli*. Existen tres vías mayoritarias de establecimiento de persistencia en *E. coli* K-12 formadas por sistemas toxina-antitoxina (TA). La vía Obg/HokB (A), vía polifosfato/Lon/mRNA interferasa (B) están bajo el control de la señalización por (p)ppGpp o alarmona, mientras que la vía TisB (C) es activada por la inducción de la respuesta SOS por estrés. Las toxinas HokB y TisB de tipo I inducen la persistencia eliminando la fuerza protón-motriz, mientras que las toxinas de tipo II como la mRNA endonucleasa interfiere en la traducción ribosomal. E, P y A designan los sitios de unión exit, peptidyl y aminoacyl-tRNA respectivamente. Pi (fosfato inorgánico). (Modificada a partir de la figura en Harms et al., 2016).

conduce a un colapso de la fuerza protón-motriz y a la inhibición de la síntesis de ATP. Las toxinas tipo II son más diversas, aunque mayormente actúan como inhibidores de la traducción de proteínas.

La activación de los módulos TA se va a producir como consecuencia de un desbalance en los niveles de toxina y antitoxina. En los módulos TA tipo I, este desbalance frecuentemente ocurre como consecuencia de una regulación transcripcional, mientras que las antitoxinas en los módulos TA tipo II suelen ser degradadas por la activación de proteasas como Lon en respuesta a la presencia de (p)ppGpp u otras señales (Fig. 33).

La respuesta SOS modula el estado de persistencia a través de la regulación de módulos TA, al menos en *E. coli*. Así, la presencia de roturas en el DNA recluta a la proteína RecA, que a través de un mecanismo no totalmente conocido va a activar al módulo TA tipo I tisB/istR, y como consecuencia la proteína TisB se va a insertar en la membrana, disipando la fuerza protón-motriz e inhibiendo la síntesis de ATP, lo que conduce al establecimiento de estado de persistencia (Fig. 33).

7. La piroptosis: mecanismo de defensa frente a la infección.

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

Las células pueden morir a través de distintas vías metabólicas, que producen diferentes resultados morfológicos y fisiológicos. La **apoptosis** es probablemente el programa de muerte celular más usual, y es 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. 34).

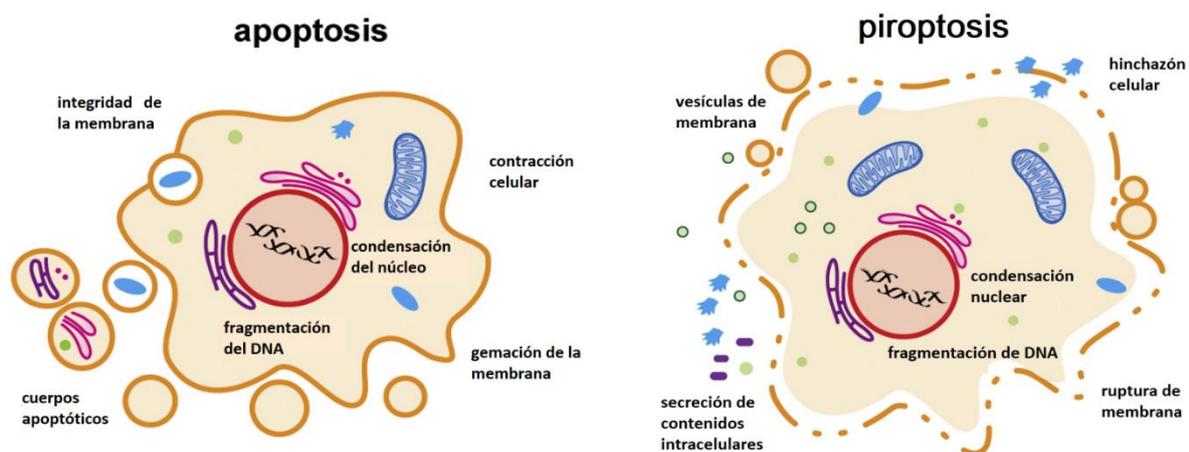


Figura 34. Modos de muerte celular programada y sus características. La retención de la integridad de la membrana plasmática y la formación de cuerpos apoptóticos hacen que la apoptosis sea un programa de muerte inmunológicamente silencioso. Por el contrario, la inflamación se desencadena cuando las células mueren por necrosis o piroptosis, pues se secretan citoquinas proinflamatorias y liberan los contenidos citoplasmáticos al espacio extracelular. Modificada a partir de figura en Lamkanfi & Dixit (2010)

Uno de los últimos mecanismos de muerte celular que se ha identificado es la **piroptosis** (Fig. 34), 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. 35). 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 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

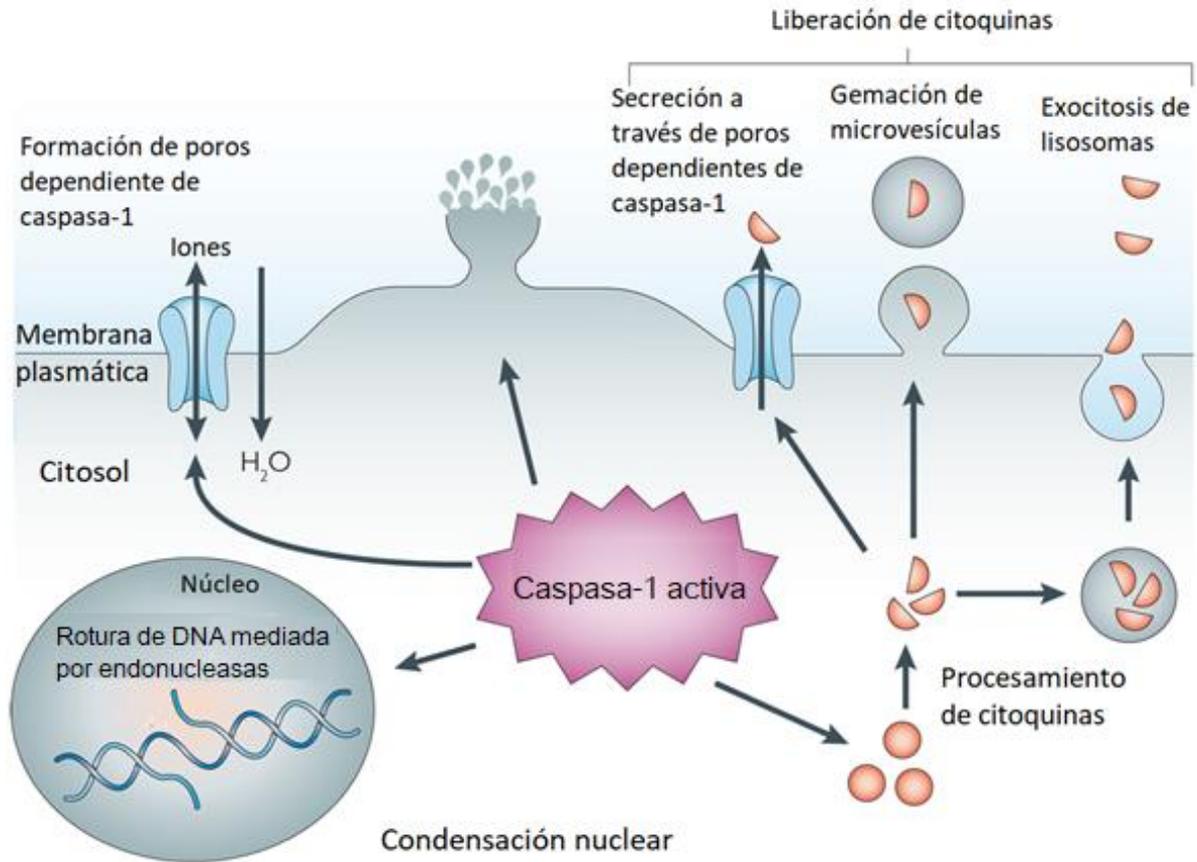


Figura 35. Piroptosis, una respuesta inflamatoria del huésped. En respuesta a múltiples estímulos, la caspasa-1 es procesada proteolíticamente y se activa, lo que resulta en un programa conservado de muerte celular llamado piroptosis. La activación de la caspasa-1 también conduce a la formación rápida de poros 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 la caspasa-1 y liberados a través de los poros generados. Otros mecanismos de secreción sugeridos incluyen la exocitosis de lisosomas independiente de caspasa-1 y la expulsión de microvesículas. Además, la actividad de caspasa-1 resulta en la rotura del DNA cromosómico por una endonucleasa no identificada, pero no se producen los fragmentos oligonucleosomales observados durante la apoptosis. Se mantiene la integridad nuclear. Modificada de figura en Bergsbaken et al (2009).

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. 35):

- 1) A través de los poros
- 2) Liberación de microvesículas
- 3) Exocitosis de lisosomas.

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

Entre los factores celulares que activan la caspasa-1 se encuentran las **proteínas NLR** (“Nod-like receptors”), que son unas 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. 36). En el genoma humano están codificadas 23 proteínas de la familia NLR y 34 en el genoma de ratón. En la Figura 37 se ilustran algunos ejemplos de moléculas NLR y de las señales que las activan.

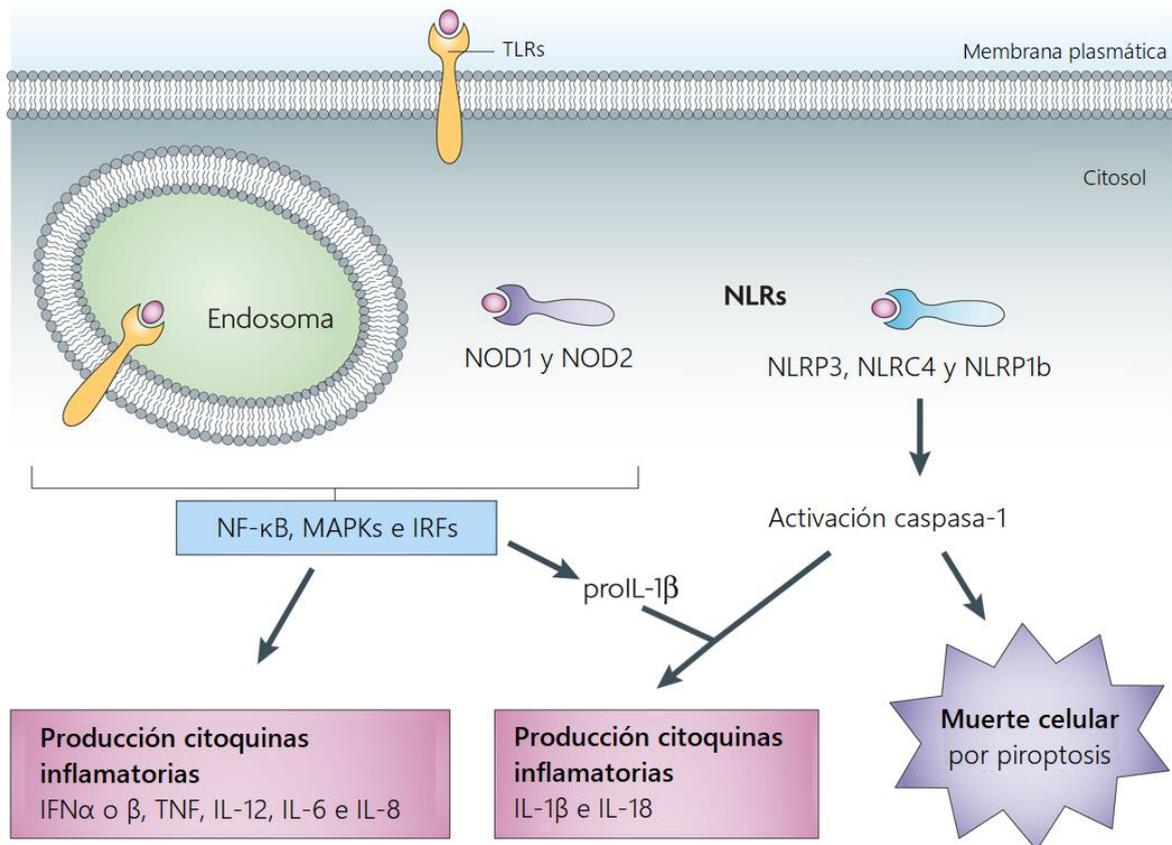


Figura 36. La detección de señales de peligro derivadas del huésped y del microorganismo lleva a dos respuestas distintas: activación de la célula o muerte celular. Los dominios ricos en leucina (LRR) median el reconocimiento por parte del huésped de patrones moleculares asociados a patógenos o señales de peligro. Los receptores TLR son proteínas transmembrana que contienen dominios LRR que detectan señales de peligro en el medio extracelular y dentro de endosomas, iniciando una cascada de señalización que lleva a la activación de la célula (a través de NF-κB, MAPKs e IRFs) y una producción de citoquinas inflamatorias. Los NLRs participan en el reconocimiento de las señales de peligro introducidas en el citosol de la célula huésped, resultando en la producción de citoquinas o 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-1β. Modificada de figura en Bergsbaken et al (2009).

La primera proteína de esta familia en ser descrita fue **NLRP1**. En ratón (denominada Nlrp1b), se ha visto que es responsable de la 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 muramil-dipéptido (producto de degradación de la pared celular de bacterias).

Una de las proteínas NLR más estudiada es **NLRP3**, que responde a muy diferentes estímulos 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 -amiloides. No es claro cómo una simple molécula puede responder a tal variedad de estímulos, la hipótesis planteada es que NLRP3 debe “sentir” una señal terminal común a todos. 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, la **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, pero peor caracterizados.

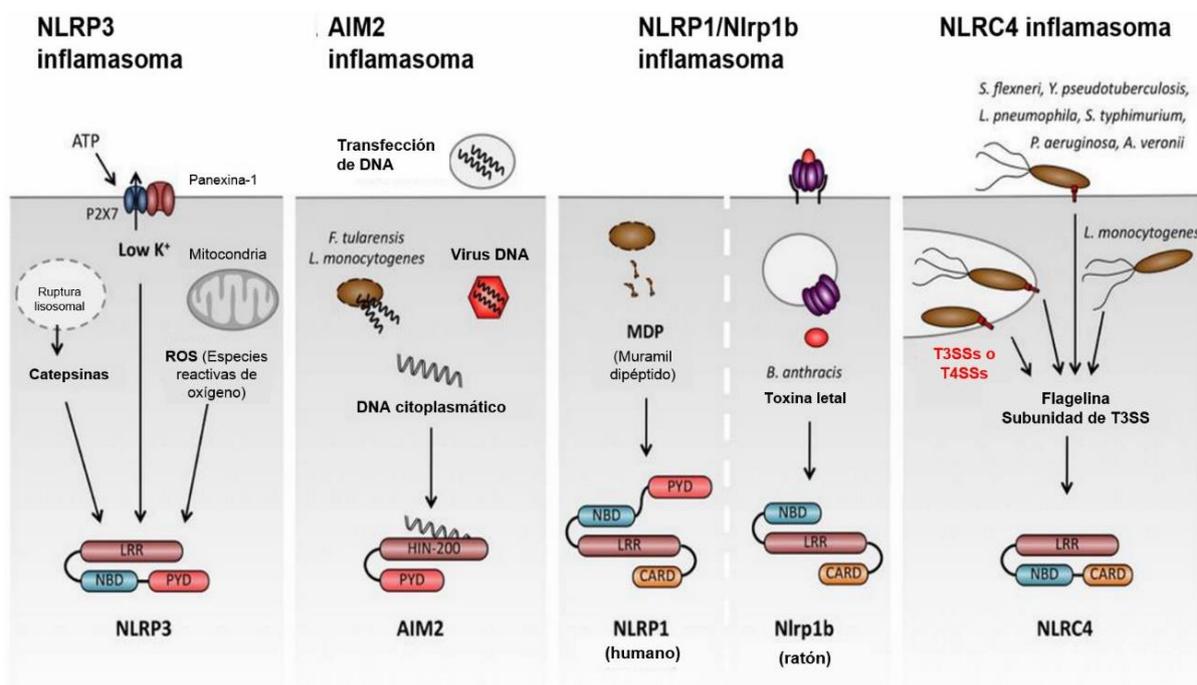


Figura 37. Los receptores del inflammasoma reconocen una variedad de patógenos microbianos y señales de peligro. NLRP3 responde a numerosos estímulos, cuyas señales terminales comunes participan en la ruptura lisosomal y en la liberación de catepsinas, la liberación de potasio y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). AIM2 funciona como un sensor de DNA citosólico, detectando el DNA introducido por transfección, infección con la bacteria citosólica patogénica *Francisella tularensis* o *Legionella monocytogenes* o virus de DNA. La NLRP1 humana responde a muramil-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 del canal del sistema de secreción tipo 3 (T3SS rod subunit). Modificada de figura en Broz & Monack (2011).

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 el ensamblaje del inflammasoma.

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. 38).

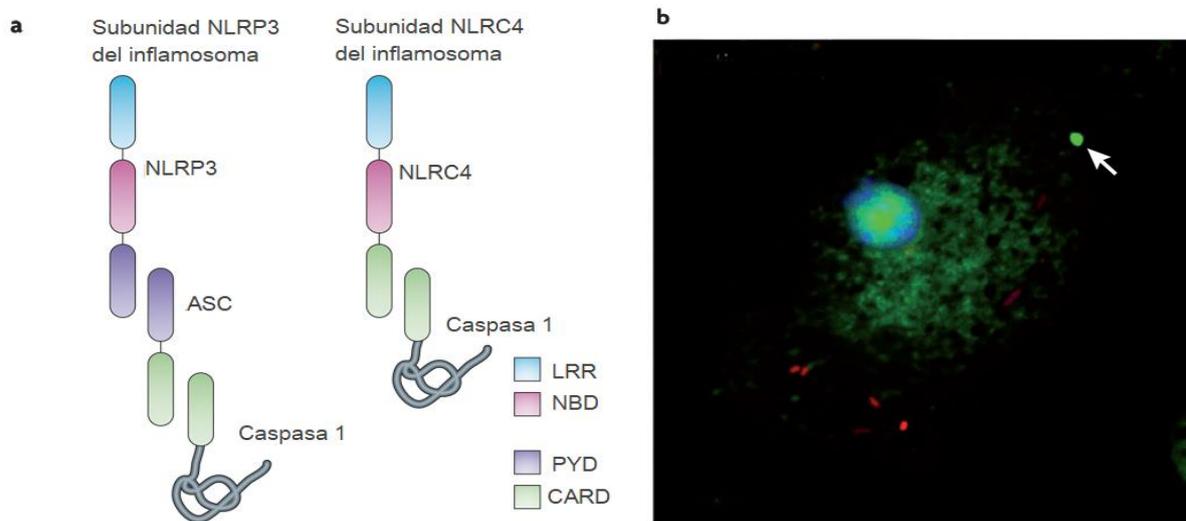


Figura 38. Componentes del inflammasoma y visualización del complejo del inflammasoma. (a) Los dominios ricos en leucina (LRR) de los receptores NLR están implicados en la detección de un rango de señales de “peligro” intracelulares. Tras el reconocimiento de ligando, el dominio NBD media una asociación 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 la caspasa-1. Otros NLRs como NLRC4 contienen un dominio CARD e interaccionan directamente con la 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). La forma activa de la caspasa-1 se encuentra a menudo concentrada dentro de un foco único (indicado con la flecha) y distribuido de manera difusa por el citoplasma. Modificada de figura en 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:

- 1) 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.
- 2) 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.

8. Inmunidad frente a los patógenos a través de la limitación nutricional.

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

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

8.1. Hierro.

El hierro (Fe) es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre y el más abundante metal de transición en el cuerpo humano. Para las bacterias, el Fe es un **cofactor** de muchas enzimas, implicadas en procesos muy relevantes como la replicación y la transcripción y es clave para el metabolismo. Los grupos protoporfirínicos **hemo** (Fig. 39), 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. Por otro lado, en áreas endémicas para enfermedades infecciosas como malaria y tuberculosis, se ha constatado que la utilización de suplementos dietéticos con Fe tiene un efecto exacerbante sobre estas enfermedades infecciosas.

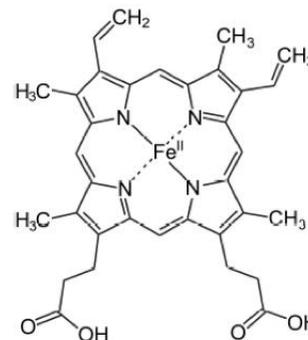


Figura 39. **Estructura del grupo hemo.** Se pueden ver los cuatro anillos pirrólicos y el átomo de hierro ferroso en el centro.

La mayoría del hierro que tienen los mamíferos se encuentra en la forma de grupo hemo. El **metabolismo** del grupo hemo es un proceso muy controlado, que, entre otras funciones, tiene la de restringir el acceso al hierro de los microbios. La mayor parte de los grupos hemo se encuentran formando parte de la **hemoglobina** de los glóbulos rojos, seguidos por los que forman parte de la mioglobina de las células musculares, y los que componen los citocromos y otras hemoproteínas (Fig. 40A).

El Fe requerido para mantener la síntesis de hemoglobina se obtiene fundamentalmente por **macrófagos hemofagocíticos** que se encargan de retirar glóbulos rojos envejecidos (Fig. 40B). En el **fagosoma** de estos macrófagos la hemoglobina es degradada y el grupo hemo pasa al citoplasma por medio del transportador **HRG1** (“*Heme-Responsive Gene-1*”). La enzima **HO-1** (“*Hemeoxygenase-1*”) se encarga de extraer el Fe del grupo hemo. Este Fe puede acumularse acompañado a la proteína **ferritina** o translocado por el transportador **ferroportina** (FPN) a la **transferrina** plasmática. La transferrina se encarga de transportarlo a los tejidos eritropoyéticos donde es utilizado para la síntesis de nuevos grupos hemo (Fig. 40C).

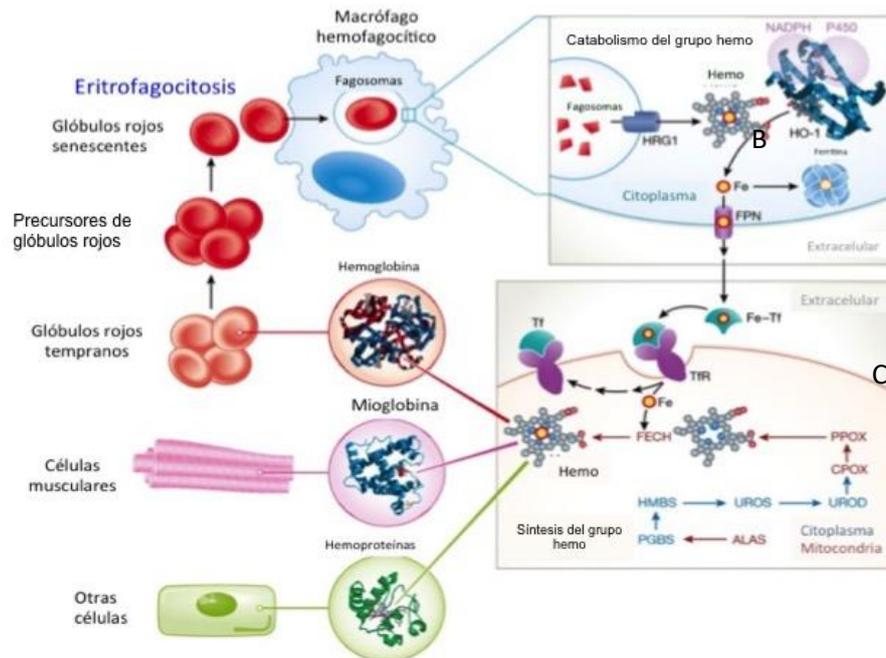


Figura 40. Interrelaciones entre el metabolismo del hierro y del grupo hemo. (A) La mayor cantidad de hierro en mamíferos se localiza en el grupo hemo. (B) El hierro requerido para la síntesis de hemoglobina se obtiene mayoritariamente de la degradación hemofagocítica de glóbulos rojos senescentes. (C) En el plasma el hierro se une a transferrina (Tf) y llegará al compartimento eritropoyético donde se utilizará para la síntesis del grupo hemo. Modificada a partir de la figura en Soares & Weiss (2015).

La exportación de Fe por los macrófagos está regulada por la hormona **hepcidina**, un péptido secretado por los hepatocitos, que se une al transportador **FPN** y dispara su degradación proteolítica. Esto conduce a una inhibición de la salida de Fe desde los macrófagos (y otras células). Además, la hormona disminuye la absorción intestinal de Fe, lo que conduce a un estado de **hipoferremia**. La producción de hepcidina se aumenta en respuesta a una hiperferremia (valores de Fe circulantes por encima de la normalidad), citoquinas (IL-1, IL-6, IL-22, entre otras) y presencia de **lipopolisacáridos** bacterianos. En consecuencia, una función de esta hormona es también la de dificultar el acceso al hierro de patógenos extracelulares (Fig. 41.A-B). Así, cuando se produce un proceso infeccioso, el sistema inmunitario innato va a intentar neutralizar el agente infeccioso, induciendo lo que a veces es llamado **respuesta de fase aguda** (APR, “*Acute-Phase Response*”). A través de la producción de citoquinas se van a inducir una serie de respuestas sistémicas, entre ellas, la APR altera el metabolismo del hierro en la dirección de minimizar la disponibilidad 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.

También los macrófagos, en respuesta a la presencia de patógenos extracelulares, son capaces de inducir la captación de Fe unido a transferrina presente en el suero a través de la expresión de receptores de transferrina; también cuentan con receptores de lactoferrina, receptores para la **proteína Lcn2** (lipocalina2, proteína con afinidad por sideróforos bacterianos, que son moléculas secretadas por muchas bacterias patógenas con la finalidad de unir hierro) y el transportador de metales divalentes **DMT1** (Fig. 41.C-F).

Por otro lado, los macrófagos, además de su función fagocítica sobre glóbulos rojos envejecidos, disponen de receptores capaces de captar a complejos circulantes de **hemoglobina-haptoglobina** y de **hemo-hemopexina** (HPX) a través de los receptores CD-163 y CD-91, respectivamente. La haptoglobina (HP) y la HPX son dos proteínas plasmáticas con gran afinidad por hemoglobina y por el grupo hemo, respectivamente (Fig. 41.G-I). Todos estos mecanismos de captación de tanto eritrocitos dañados, como de hemoglobina-haptoglobina y de hemo-HPX se encuentran acoplados a la síntesis de nuevos grupos hemo, ya que gracias al transportador HRG1 localizado en la membrana del fagolisosoma se permite la salida del grupo hemo del mismo y por la proteína HO-1 se acopla al catabolismo del grupo hemo (Fig. 41.J).

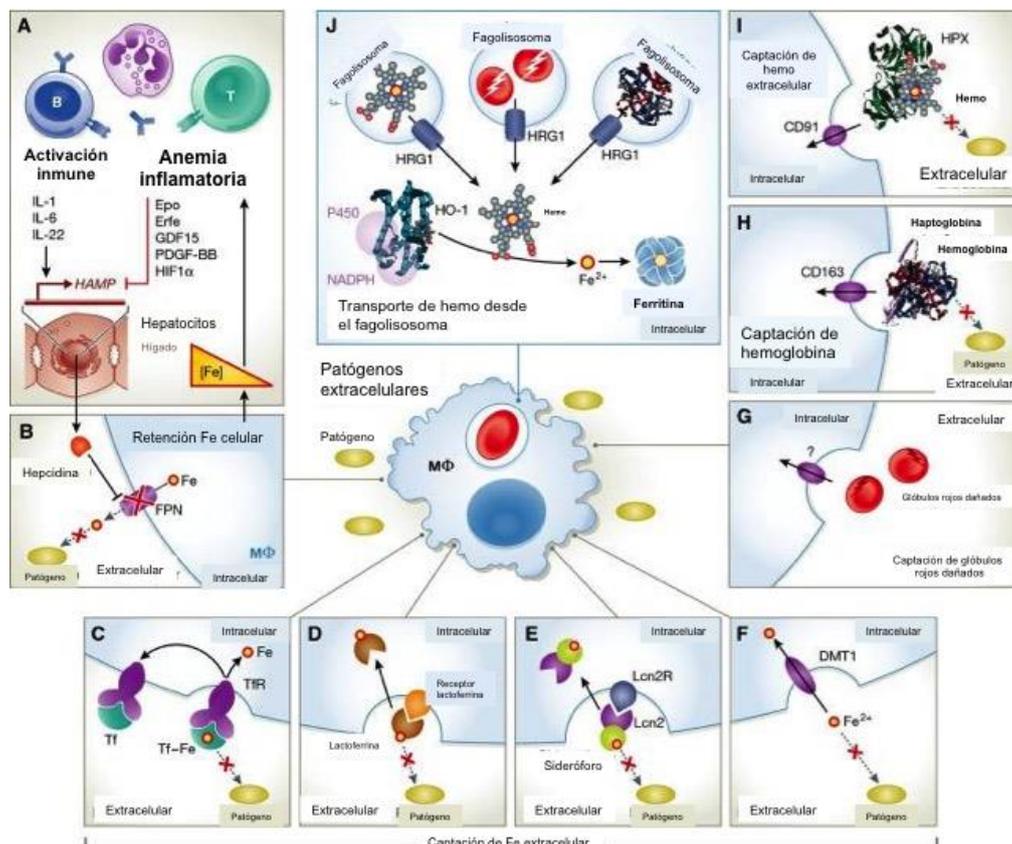


Figura 41. Regulación del metabolismo del hierro en respuesta a patógenos extracelulares.

Modificada a partir de figura en Soares & Weiss (2015).

Además de encontrarse acoplado con el hemo, el Fe es almacenado intracelularmente (como Fe^{3+}) formando complejos con la proteína ferritina. Por otro lado, la proteína **NRAMP1** ("Natural Resistance-associated Macrophage Protein 1"), localizada en la membrana fagosomal,

bombea Fe^{2+} y Mn^{2+} fuera del compartimento fagosomal, lo que reduce el acceso a estos metales para los patógenos intracelulares que residen en el fagosoma.

Para combatir la adquisición de Fe^{3+} mediada por los sideróforos, los vertebrados producen la proteína **NGAL** (“*eutrophil geGlatinase-Associated Lipocalin*”), también denominada lipocalina 2 o siderocalina, que une y secuestra algunos sideróforos (Fig. 42).

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 mayoría del hierro unido a transferrina es captado en la médula ósea, donde los precursores de los eritrocitos incorporan el hierro al grupo hemo durante la síntesis de hemoglobina.

El 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.

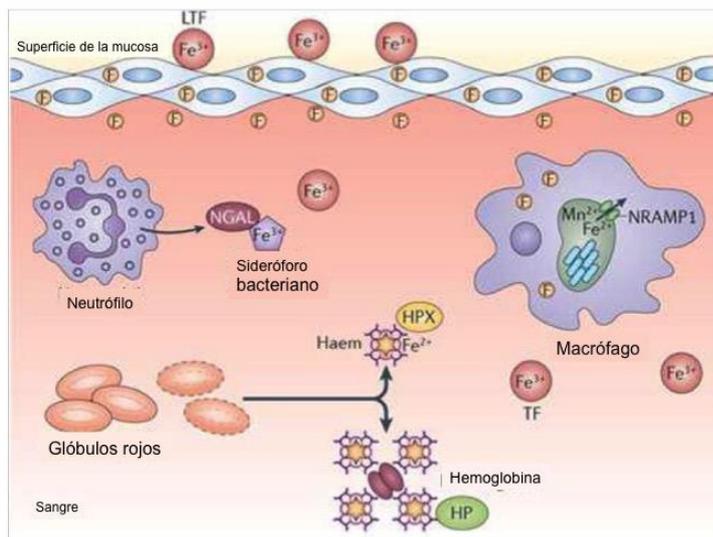


Figura 42. Limitación del hierro durante las infecciones bacterianas. El hierro (Fe^{3+}) puede ser retenido de diferentes formas: por la ferritina (F) en el interior celular (no en la imagen), por la transferrina (TF) en el suero o por la lactoferrina (LTF) en la superficie de las mucosas. Cuando tiene lugar un proceso de hemólisis, la hemoglobina se une a la haptoglobina (HP) y el grupo hemo a la hemopexina (HPX). Modificado a partir de 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. 43). 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 interactuar directamente con transferrina y

lactoferrina, y captar el hierro que transportan. Una vez que han unido Fe, los sideróforos van a ser internalizados en las bacterias a través de un sistema de transporte mediado por el sistema **TonB-ExbB-ExbD**. En el periplasma, las **proteínas SBPs** (“*Substrate-Binding Proteins*”) reconocen los complejos sideróforo- 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.

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. 43). 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. 43). 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.

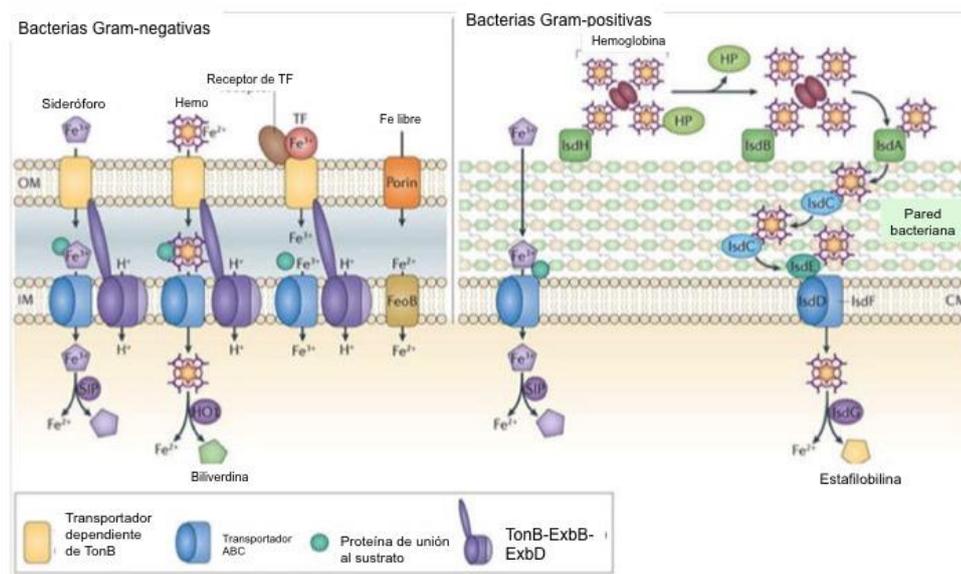


Figura 43. Adquisición del hierro durante las infecciones bacterianas. Tanto las bacterias Gram positivas como Gram negativas poseen sistemas para obtener Fe^{3+} gracias a los sideróforos o directamente del grupo hemo, de la transferrina o del Fe^{2+} libre. No todos los sistemas se encuentran en todos los organismos, pero en la figura se observan algunos como las familias HO1 e IsdG que, si lo hacen, tanto en bacterias Gram positivas como negativas. Modificada de figura en Hood & Skaar (2012).

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. 43). Algunas bacterias también son capaces de transportar Fe^{2+} libre a través de las membranas mediante transportadores de la familia FeoB. La proteína **FeoB** es una proteína grande de membrana que contiene un dominio de unión a GTP y que son similares a las proteínas eucarióticas de unión a nucleótidos de guanina (proteínas G).

La 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.

8.2. Manganeso y Zinc.

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. 44). 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 (nanomolar).

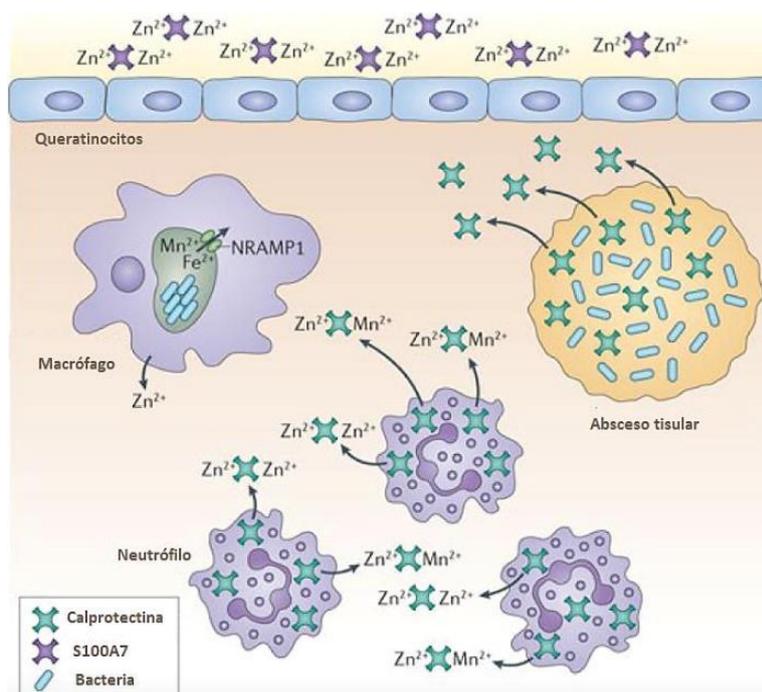


Figura 44. **Quelación de Mn^{2+} y Zn^{2+} por proteínas del hospedador.** Proteínas de la familia de S100 van a secuestrar a estos dos iones tanto en la superficie epitelial como dentro de los abscesos producidos por las bacterias. Modificada de figura en Hood & Skaar (2012).

8.3. Cobre.

Desde hace milenios se conocen los efectos antibacterianos del cobre, habiéndose usado con finalidades industriales para evitar el crecimiento de bacterias y habiéndose 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. 45A).

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. 45A).

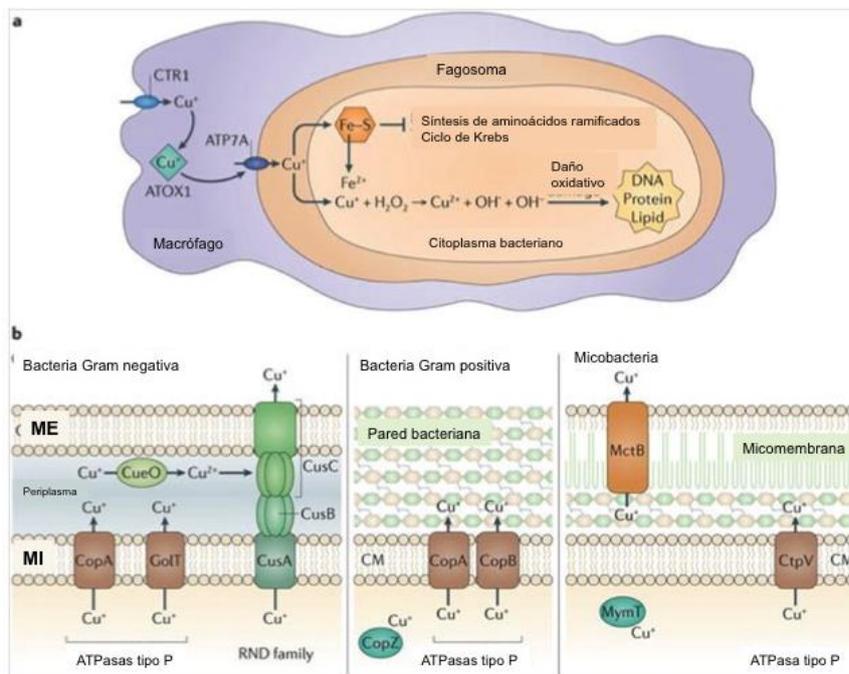


Figura 45. **Nuevas perspectivas sobre los efectos del cobre sobre la inmunidad innata.** (A) Mecanismos de intoxicación por cobre dentro de los macrófagos. (B) Las bacterias tienen diversos mecanismos para detoxificar su citoplasma cuando se encuentran en medio con alta concentración de cobre. Modificado a partir de figura en Hood & Skaar (2012).

El impacto directo de la inmunidad nutricional en infecciones humanas se muestra claramente cuando se observan pacientes con enfermedades hereditarias que afectan a la homeostasis de los metales como pueden ser la **enfermedad de Wilson** (Cu) o la **hipercalprotectinemia** (Zn). Además, polimorfismos en el gen codificante para NRAMP1, lo cual impide el tráfico intracelular tanto de Mn como de Fe, se ha asociado con un aumento en la susceptibilidad a patógenos como *Salmonella* o *Mycobacterium*. Además, se ha observado que pacientes con una mayor concentración de hierro normalmente sufren un mayor número de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, pacientes que reciben a menudo transfusiones sanguíneas tienen un aumento de Fe circulante que los predispone a infecciones. También, los macrófagos de pacientes con una forma hereditaria de hemocromatosis que resulta en la **mutación C282Y del gen HFE** y la cual produce una bajada en la concentración de Fe. El gen HFE codifica para una proteína perteneciente a la familia de moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad HLA-A. Esta proteína participa en la regulación de la absorción del hierro y se expresa en tejidos como el hígado y el intestino delgado. Esta observación ha llevado a la hipótesis de que estos pacientes son resistentes a la infección por patógenos intracelulares como *Salmonella typhi* o *M. tuberculosis*. Si este fuera el caso, la resistencia a ciertos patógenos podría ser una presión evolutiva para mantener un determinado alelo en la población.

9. Relación entre el sistema inmunitario y la flora intestinal.

El tracto intestinal de los mamíferos contiene una comunidad diversa constituida por billones de microorganismos que han co-evolucionado 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 de mantener la homeostasis, el sistema inmunitario desempeña un papel clave en el mantenimiento de la diversidad microbiana, en los sitios anatómicos permitidos, al tiempo que está vigilante frente a invasiones de microbios patogénicos. Existe una interacción recíproca entre el **sistema inmunitario** y el **microbiota intestinal**, en cuanto a que el microbiota es fundamental para el adecuado desarrollo del sistema inmunitario y las respuestas inmunitarias, por su parte, van a regular la estructura y composición de la flora intestinal.

El intestino humano aloja unos 100 billones de microbios, pertenecientes mayoritariamente a unas 500 especies de bacterias. La **composición bacteriana** varía a lo largo del tracto intestinal, y cada especie bacteriana coloniza un determinado nicho (Fig. 46). 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. En este sentido, un factor crítico que define la distribución y composición del microbiota es el requerimiento de nutrientes de los microorganismos comensales.

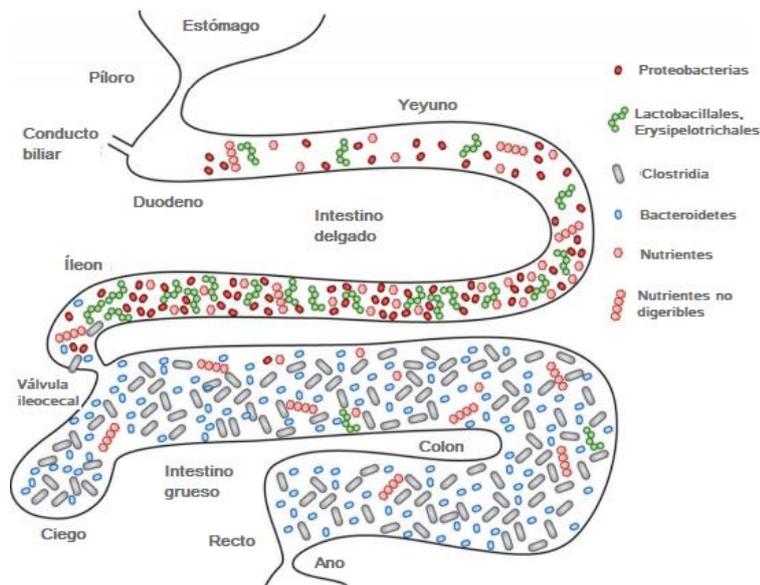


Figura 46. Localización de los grupos de bacterias dominantes dentro del intestino. El intestino delgado es rico en nutrientes que son utilizados por los microbios y el hospedador para crecer. *Proteobacterias* (principalmente *enterobacterias*), *Lactobacillales* y *Erysipelotrichales* (especialmente *Turicibacter*) son los microorganismos dominantes en el intestino delgado. Por el contrario, el intestino grueso es pobre en nutrientes y por tanto hospeda a una menor cantidad de estas bacterias, mientras que *Bacteroidetes* y *Clostridia*, que pueden utilizar como fuente de energía a la fibra que el hospedador no puede digerir, predominan en esta zona. Modificada de figura en 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. 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 (Fig.47). 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. 47). Por ejemplo, especies de *Bifidobacterium* bloquean la colonización por parte de *E. coli* patogénica; de forma similar, un pH óptimo es necesario para el crecimiento de *Bacillus cereus* para la secreción de enterotoxinas.

Una estrategia alternativa utilizada por la comunidad microbiana comensal es el consumo preferencial de los nutrientes requeridos para el crecimiento de las bacterias patogénicas. Por ejemplo, *E. coli* comensal compite con la variante hemorrágica por ácidos orgánicos, aminoácidos y otros nutrientes (Fig. 47). 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*.

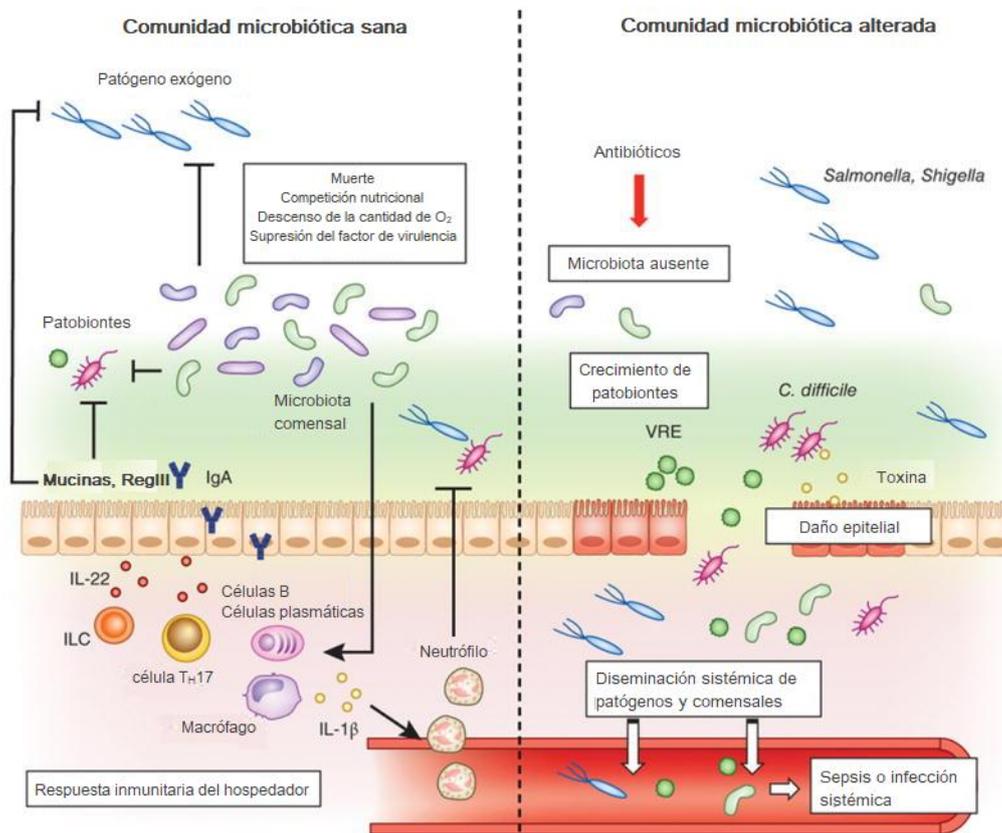


Figura 47. El microbiota comensal previene de la colonización por patógenos exógenos y patobiontes. En los individuos sanos, las bacterias residentes ocupan nichos de colonización. El microbiota comensal suprime la proliferación y la colonización de patógenos entéricos y patógenos oportunistas a través de diversos mecanismos, como la producción de bacteriocinas y ácidos grasos de cadena corta que inhiben directamente el crecimiento de estos. La microbiota comensal facilita la función de la barrera del huésped a través del aumento de la capa de mucus, la inducción de moléculas antimicrobianas, como RegIII β y γ , y la regulación de la secreción de IgA, además estimulan a los macrófagos mediante la producción de pro-IL-1 β . La infección por patógenos resulta en la activación de IL-1 β , que promueve el reclutamiento de neutrófilos y la erradicación de patógenos. 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* y *Shigella*) y permite el crecimiento descontrolado de patógenos oportunistas - patobiontes (como *Clostridium difficile* y enterococos resistentes a vancomicina) que tienen el potencial de expandirse sistémicamente e inducir shock séptico. Modificada de figura en Kamada et al (2013).

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. 48).

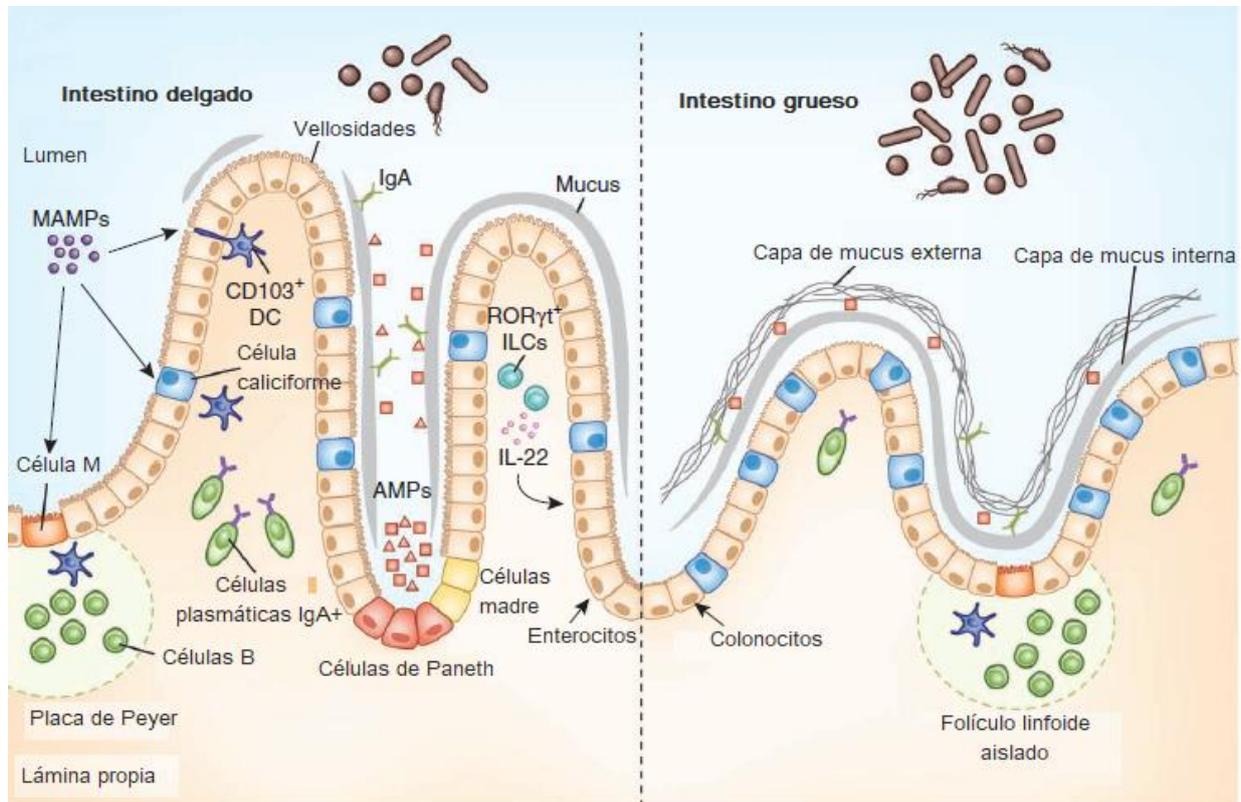


Figura 48. Confinamiento anatómico del microbiota a lo largo del intestino. El epitelio intestinal se compone de una única capa de enterocitos o colonocitos, y el sistema inmunitario cumple el papel de proteger la integridad de esta barrera. En el intestino delgado, la capa de mucus es discontinua y con pocas células caliciformes. En esta zona hay gran cantidad de células de Paneth en las criptas y secretan AMPs, que pueden unirse a la capa de mucus. A través de esta barrera, las células M y las células caliciformes pueden reconocer antígenos a través de MAMPs y presentárselos a células dendríticas (DCs). Las ILCs ROR γ t pueden reconocer señales microbianas y producir IL-22 colaborando así en la función de barrera de las IECs. IgAs específicas frente a las bacterias comensales son producidas por las células plasmáticas en la lámina propia, proceso activado por las células dendríticas mediante un mecanismo dependiente de células T. El intestino grueso contiene una capa de mucus más gruesa y continua para compartimentar el microbiota, en la que la IgA y los AMPs tienen un papel secundario. Modificada de figura en Brown et al (2013).

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

En cambio, la capa de mucus en el intestino delgado carece de caras interna y externa distinguibles, y resulta secretada de forma discontinua a lo largo de la superficie apical. En este tejido, arsenales de AMPs son fundamentales para segregar al microbiota del epitelio. Estos incluyen las defensinas y las lectinas tipo C, que son producidas principalmente por las **células de Paneth**, una línea celular propia del intestino delgado y que se localizan cerca de las células madre 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 ROR γ t (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 flagelina y ácidos nucleicos microbianos (RNA y DNA). Las interacciones PRR-MAMP activan una variedad de vías de señalización, promoviendo importantes funciones como la producción de mucinas, AMPs e IgA. Estudios en modelos animales han mostrado que la falta de algunas PRRs conduce a alteraciones en la barrera intestinal que conducen a una invasión microbiana de órganos internos. El reconocimiento de MAMPs es particularmente importante en el intestino delgado, donde no existe una gruesa capa de mucus que aleje al microbiota de la pared intestinal.

Mientras que el sistema inmunitario innato da protección mediante la capa de mucus, AMPs e ILCs para controlar de forma indiscriminada la composición del microbiota y su penetración del epitelio, el sistema inmunitario adaptativo, a través de la producción de IgA, supone un nivel adicional de protección. La producción de IgA ocurre tras la estimulación de linfocitos B presentes en los **parques 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 (Fig. 49). 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.

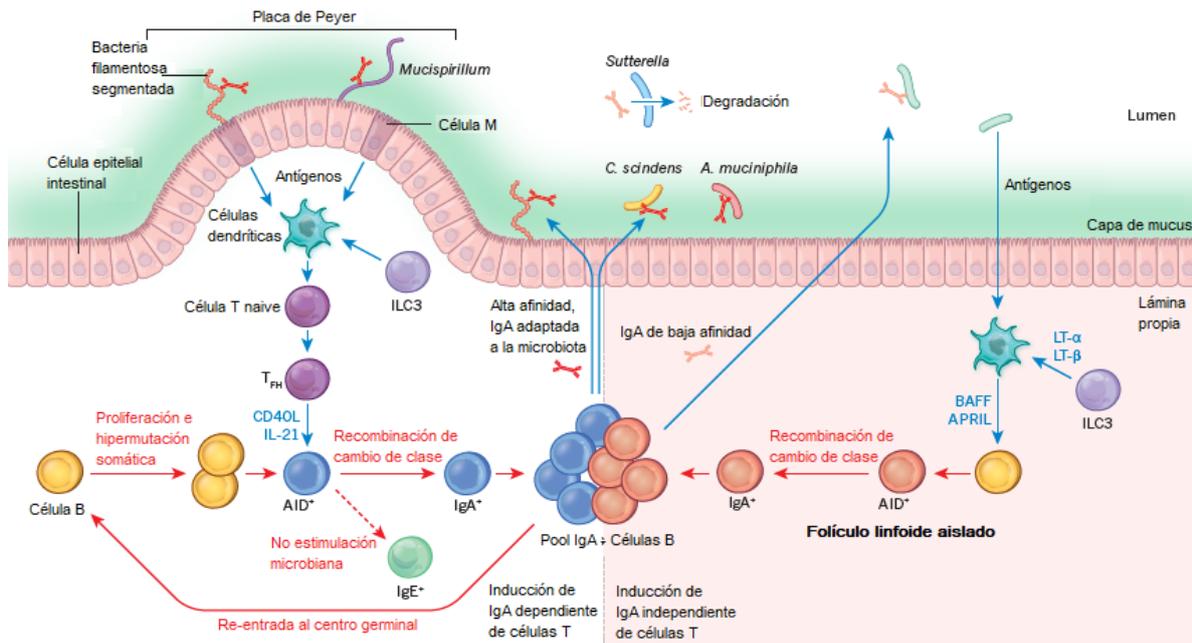


Figura 49. Inducción de IgAs en tejidos mucosos. La recombinação de cambio de clase de IgA dependiente de células T (izquierda) tiene lugar mayoritariamente en las placas de Peyer, donde las células dendríticas están localizadas cerca de la superficie del epitelio para capturar antígenos de microbios que van a ser transferidos por las células M. Las células dendríticas inducen la diferenciación de las células T CD4+ en TFH. CD40L e IL-21 de las células TFH inducen la expresión de AID en las células B y promueve la recombinação para el cambio de clase a IgA. La recombinação de cambio de clase a IgA independiente de células T (derecha) ocurre predominantemente en la lámina propia y en folículos linfoides aislados (IFLs), donde BAFF y su homólogo APRIL, que derivan de las células dendríticas, van a promover la expresión de AID en las células B. Otros componentes que influyen en estas vías son TGFβ (procedente de células dendríticas y del estroma) y el ácido retinoico (no mostrado), ILC3 que expresan RORγT y la microbiota intestinal. La vía independiente de células T promueve la producción de IgAs con poca afinidad, proceso que es estimulado directamente por la presencia de la microbiota. La vía dependiente de células T tiende a ser activada por bacterias que colonizan la superficie del epitelio, como bacterias filamentosas segmentadas (SFB), *Mucispirillum*, *Clostridium scindens* y *Akkermansia muciniphila*. Los clones de células B que expresan IgAs persisten durante mucho tiempo y pueden volver a entrar en un centro germinal, donde experimental una hipermutación somática adicional para producir IgAs de alta afinidad que se adapta a la composición cambiante de la microbiota. Modificada de figura en Honda et al (2016).

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 de este con la finalidad de mantener la homeostasis. Sin embargo, la homeostasis puede resultar alterada tras la ingestión gastrointestinal de patógenos. La respuesta inmunitaria frente al patógeno puede producir efectos colaterales tales como el daño de tejidos y la alteración de la composición del microbiota. A veces, una fuerte respuesta proinflamatoria puede romper la barrera intestinal, lo que va a favorecer la eficiencia de colonización y la supervivencia del patógeno (Fig. 50).

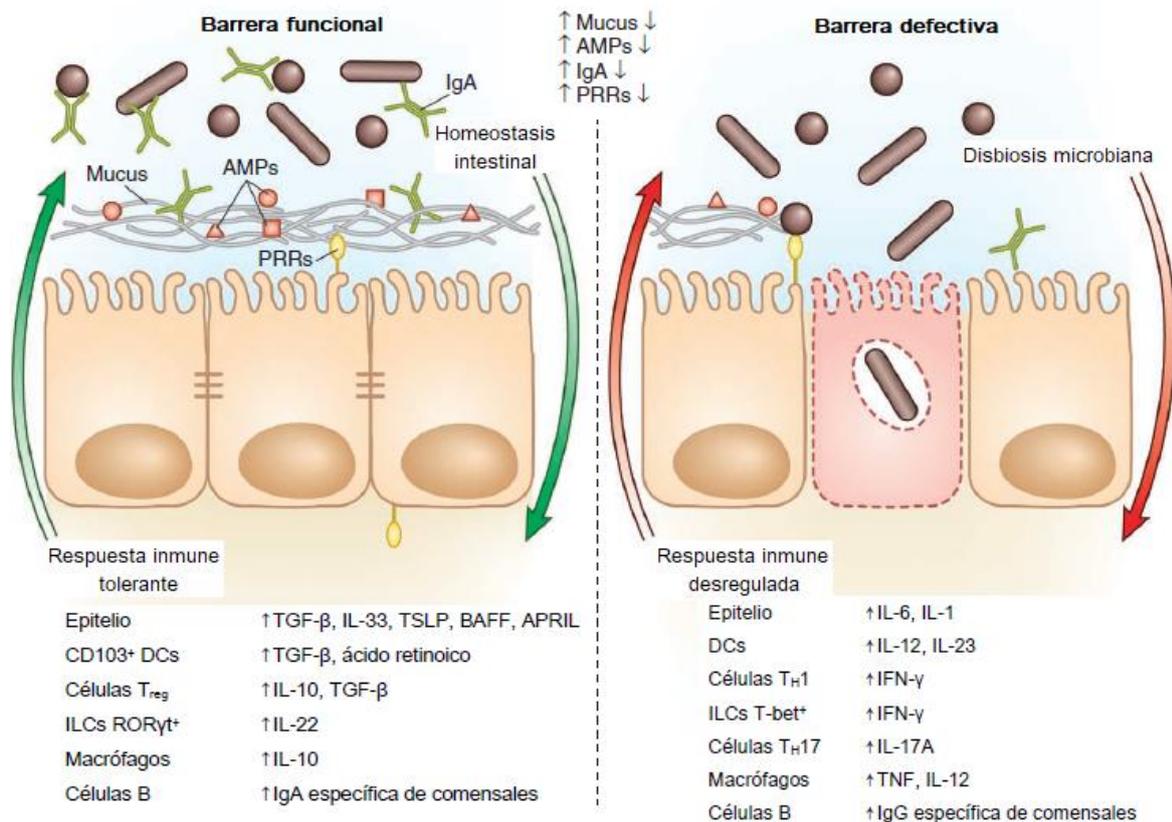


Figura 50. Las barreras innatas garantizan una respuesta tolerante al microbiota. La presencia de una barrera funcional, con cantidades normales de PRRs, mucus, AMPs e IgA secretada, promueve la homeostasis intestinal con el microbiota. En situaciones de inmunodeficiencia o síndromes inflamatorios con 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 figura en Brown et al (2013).

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

10. Bibliografía.

- **Alekshun, M.N. and Levy, S.B.** (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128: 1037-1050.
- **Andersson, D.I. and Hughes, D.** (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 12: 465-478.
- **Bautista-de Lucio, V. M., Ortiz-Casas, M., Bautista-Hernández, L. A., López-Espinosa, N. L., Gaona-Juárez, C., Salas-Lais, A. G., Frausto-del Río, D. A. and Mejía-López, H.** (2013). *Diagnostics Methods in Ocular Infections—From Microorganism Culture to Molecular Methods*, Common Eye Infections, Dr. Imtiaz Chaudhry (Ed.), InTech.
- **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.
- **Brown, E.M., Sadarangani, M. and Finlay, B.B.** (2013). The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat Immunol* 14: 660-667.
- **Broz, P. and Monack, D.M.** (2011). Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunol Rev* 243: 174-190.
- **Buchan, B.W. and Ledebor, N.A.** (2014). Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 27: 783-822.
- **Casadevall, A. and Pirofski, L.-A.** (2000) Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.* 68: 6511-6518.
- **Eswarappa S.M., Karnam G, Nagarajan A.G., Chakraborty S, Chakravorty D.** (2009) lac repressor is an antivirulence factor of *Salmonella enterica*: its role in the evolution of virulence in *Salmonella*. *PLOS One* 4(6):e5789.
- **Georgiades K. and Raoult D.** (2011) Defining pathogenic bacterial species in the genomic era. *Frontiers in Microbiology* 1:151.
- **Harms, A., Maisonneuve, E. and Gerdes, K.** (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 354: aaf4268.
- **Hollenbeck, B.L. and Rice, L.B.** (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* 3: 421-433.
- **Honda, K., & Littman, D. R.** (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*, 535(7610), 75-84.
- **Hood, M.I. and Skaar, E.P.** (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* 10: 525-537.
- **Hughes, D.** (2003). Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. *Nat Rev Genet* 4: 432-441.
- **Kamada, N., Chen, G.Y., Inohara, N. and Nuñez, G.** (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* 14: 685-690.
- **Lamkanfi, M., & Dixit, V. M.** (2010). Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell host & microbe*, 8(1), 44-54.
- **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.
- **Nie, K. et al.** (2012). Evaluation of a Direct Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method without RNA Extraction for the Detection of Human Enterovirus 71 Subgenotype C4 in Nasopharyngeal Swab Specimens. *PLOS ONE* 7(12):e52486.

- **Parrow, N.L., Fleming, R.E. and Minnick, M.F.** (2013). Sequestration and scavenging of iron in infection. *Infect Immun* 81: 3503-3514.
- **Penchovsky, R., & Traykovska, M.** (2015). Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? *Expert opinion on drug discovery*, 10(6), 631-650.
- **Piddock, L. J.** (2006). Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 629-636.
- **Silva, M.T.** (2012). Classical Labeling of Bacterial Pathogens According to Their Lifestyle in the Host: Inconsistencies and Alternatives. *Frontiers in Microbiology* 3: 71.
- **Soares, M.P. and Weiss, G.** (2015). The Iron age of host-microbe interactions. *EMBO Rep* 16: 1482-1500.
- **Soto, S. M.** (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4(3), 223-229.
- **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.** (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1451-1470.
- **Wright, G.D.** (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 175-186.

En la red:

- https://www.biography.com/people/alexander-fleming-9296894?_escaped_fragment_ [Base de datos de biografías]
- <https://www.cdc.gov/DataStatistics/> [Esta página contiene Términos y definiciones en relación a las enfermedades infecciosas]
- <http://www.health.rg.gov/diseases/infectious/> [Información sobre organismos patógenos y sus enfermedades]
- <https://www.historychannel.com.au/articles/penicillin-is-discovered/> [Información sobre el descubrimiento de la Penicilina]
- <http://www.lib.uiowa.edu/hardin/md/micro.html> [Esta página incluye un gran directorio de páginas de Microbiología y Enfermedades Infecciosas]
- https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf [Discurso de Alexander Fleming pronunciado en la recepción del premio Nobel en 1945]
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/kanamycin> [Base de datos de drogas y fármacos del NCBI]