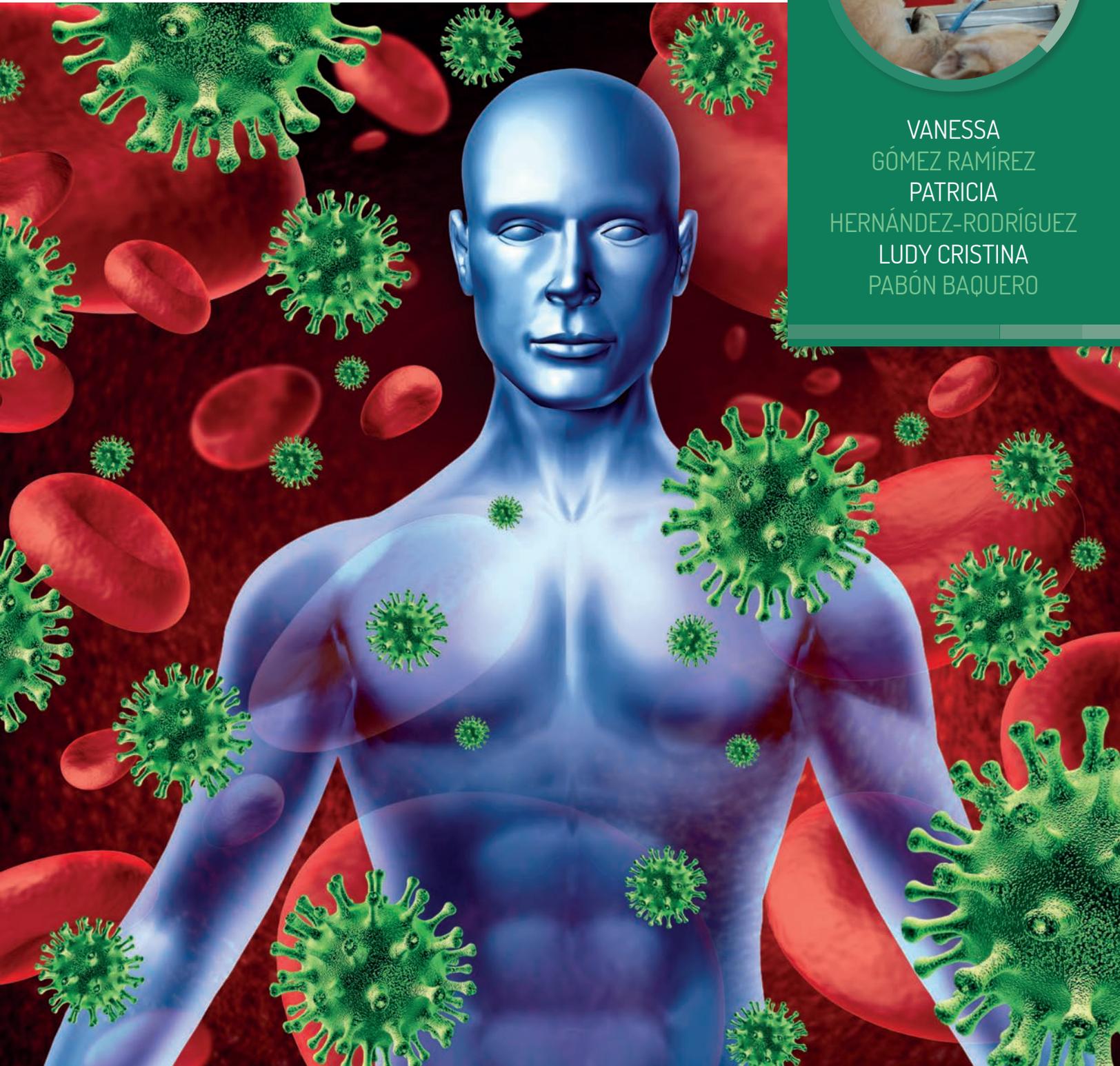


Estrategias para la búsqueda y evaluación de agentes antimicrobianos frente a bacterias resistentes



VANESSA
GÓMEZ RAMÍREZ
PATRICIA
HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ
LUDY CRISTINA
PABÓN BAQUERO



La aparición cada vez mayor de cepas resistentes a múltiples fármacos se ha convertido en una emergencia de salud pública mundial, lo que ha incrementado la frecuencia de infecciones bacterianas. El uso inadecuado y excesivo de los antibióticos ha propiciado en los microorganismos el desarrollo de resistencia, y de esta forma vienen aumentando las enfermedades infecciosas, que representan el 25% de las muertes a escala mundial. El 31% de estas son debidas a microorganismos resistentes a los antimicrobianos.

Por causa de las especificidades de cada huésped y de la resistencia desarrollada por los microorganismos, se han propuesto modificaciones de las estrategias para tratar las enfermedades infecciosas. De esta manera, en la práctica clínica es cada vez más común combinar agentes antimicrobianos.

Así mismo, se ha sugerido a escala mundial la búsqueda de nuevos compuestos que puedan evadir los mecanismos de resistencia microbiana, reducir la resistencia bacteriana, potenciar el efecto de las sustancias, lo que genera menores efectos secundarios para el huésped. Aquí la combinación de sustancias sintéticas y naturales se convierte en una estrategia novedosa. El propósito de este artículo es mostrar algunas estrategias para la búsqueda y evaluación de agentes antimicrobianos frente a bacterias resistentes.

Resistencia bacteriana a los antibióticos en el mundo y en Colombia

La resistencia bacteriana es un problema que se presenta en el contexto mundial y que afecta a la salud pública. Principalmente, se ha generado en centros hospitalarios, en unidades de cuidado intensivo, que son espacios donde es frecuente el uso no controlado de antibióticos y fármacos para prevenir infecciones. Esto ha sido confirmado por Ferri et al. (2017), quienes mencionan que se presentan muchos cambios en el DNA y resistencia de los microorganismos a una diversidad de antibióticos.

Con el desarrollo de los primeros antibióticos, que proporcionaron beneficios en la salud humana frente al control de múltiples infecciones, su uso se fue extendiendo y la aplicación en sectores como el veterinario llevó a un uso inadecuado en la medicina humana y veterinaria que ha incrementado la resistencia antimicrobiana.

De esta problemática se han derivado políticas de control frente al uso de los antibióticos tanto para humanos como para animales, debido a las interacciones que presentan con la población humana y también por ser productores de alimentos. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización de

las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) han promovido el marco legal y la implementación de políticas para reducir y controlar el uso de antimicrobianos en todo el mundo. También han promovido el desarrollo de nuevos antimicrobianos; mejorar las medidas de control de uso de antibióticos en las granjas; fortalecer el sistema de vigilancia de la resistencia antimicrobiana en humanos y animales; mejorar el conocimiento de la ecología de bacterias resistentes y genes de resistencia, y sensibilizar a la población sobre las consecuencias para la salud pública y el medio ambiente de la resistencia antimicrobiana.

Como ha sido reportado por García (2012), la resistencia bacteriana a los antibióticos ha sido estudiada en diferentes países de Latinoamérica. De esta manera, las infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente (SAMR) se han identificado en pacientes hospitalizados, con cirugía previa, cateterismo endovenoso, diálisis, entre otros. Se ha encontrado que en varios hospitales de Lima (2008-2009), el 50% de los aislamientos de hemocultivos de *S. aureus* fueron resistentes a meticilina y más del 70% de las cepas de SAMR fueron portadoras del SCCmec, un elemento móvil en el ADN asociado con la resistencia a meticilina.

Hacia la década de los noventa la presentación de casos por infecciones por SAMR en ambientes no hospitalarios fue más evidente y se reconocieron infecciones por

SAMR adquiridos en la comunidad en países de Suramérica, que posteriormente se extendieron a Norteamérica y Europa. Para *Klebsiella* y *Escherichia coli*, este mismo autor menciona un aumento de resistencia a cefalosporinas. El principal mecanismo involucrado es la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que confiere resistencia a las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación. De estas se ha reportado que en países de Latinoamérica las tasas de producción de BLEE por las enterobacterias son las más altas frente a otras regiones del mundo. Se ha encontrado el 34% para América Latina, seguido del 19,7% para Europa y el 10% para Norteamérica.

En Colombia, diversos estudios muestran la problemática de la resistencia antimicrobiana; sin embargo, un estudio realizado por Maldonado et al. (2014) relaciona los resultados de seis años de vigilancia, determinando la tendencia de la resistencia a antibióticos en Medellín y en los municipios del área metropolitana, en los que se encontraron una disminución de la resistencia a oxacilina en *S. aureus*, y un incremento de la resistencia a vancomicina en *Enterococcus faecium*.

Por su parte, en *E. coli* y *Serratia marcescens* se observó un incremento de la resistencia a ceftazidima, en contraste con una disminución en *K. pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*. Frente a los carbapenémicos se observó un incremento de la resistencia en *K. pneumoniae*, *S.*

marcescens y *E. cloacae* y una disminución en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

Mecanismos de resistencia bacteriana

Con el fin de desarrollar o identificar moléculas candidatas para su uso como antibióticos en bacterias resistentes, es necesario inicialmente conocer la forma como actúan los antimicrobianos ya existentes y las formas que encontraron las bacterias para escapar a la acción de estos.

¿Cómo trabajan los antibióticos?

Un antibiótico es una sustancia que mata o impide el crecimiento de bacterias por alguna de las siguientes estrategias que han sido reportadas por Calvo y Martínez-Martínez (2009):

1. Agentes activos sobre la pared celular: estos actúan inhibiendo la formación de la pared celular, vital para la bacteria, ya que les da resistencia e impide la ruptura en condiciones no favorables. La formación de la pared celular involucra tres etapas: primero, se da la biosíntesis de los componentes que van a integrar la pared celular, como el peptidoglucano; segundo, se da el transporte de los componentes fuera de la membrana celular de la bacteria; y tercero, se ensambla la pared celular. Ejemplos de antibióticos

que pueden bloquear cualquiera de esas etapas son los β -lactámicos, como las penicilinas, o los glucopéptidos, como vancomicina y teicoplanina, entre otros.

2. Inhibidores de β -lactamasas: las β -lactamasas son enzimas de la bacteria que degradan los antibióticos β -lactámicos; por lo cual, moléculas que bloquean estas enzimas no son responsables por sí solas de la muerte celular, sino que permiten que el antibiótico β -lactámico ejerza su función. Ejemplos de antibióticos son: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.
3. Agentes activos sobre la membrana celular: son moléculas que afectan la membrana citoplasmática de la bacteria. Tienen algunas desventajas por la toxicidad que pueden presentar en células humanas, debido a que algunos componentes de esta membrana son comunes en las dos especies. Ejemplos de estos antibióticos son: colistina, daptomicina y gramicidina, entre otros.
4. Inhibidores de la síntesis de ARN/ADN: son antibióticos que inhiben enzimas que participan en los procesos de duplicación del ADN y transcripción. Al bloquear estos procesos se detiene la replicación celular y se afecta la supervivencia de la bacteria. Ejemplos de antibióticos que actúan de esta manera son: norfloxacin y rifampicina.

5. Inhibidores del metabolismo: los organismos necesitan de folatos para la síntesis de algunos aminoácidos, purinas y pirimidinas. Estos folatos se pueden obtener del medio tal como ocurre en las células humanas; sin embargo, muchas bacterias son incapaces de conseguirlos del medio externo, y por tanto deben sintetizarlos. Los antibióticos que pertenecen a este grupo inhiben las enzimas de la ruta biosintética de los folatos. Ejemplos son: sulfametoxazol y pirimetamina.
6. Inhibidores de la síntesis de proteínas: los sitios donde se da la síntesis de proteínas, es decir los ribosomas, son diferentes en bacterias y en eucariotes, razón por la cual la inhibición de la síntesis de proteínas en bacterias es uno de los mecanismos más usados por los antibióticos. Ejemplos son: gentamicina, cloranfenicol, azitromicina, tetraciclina, entre otros.

¿Cómo una bacteria puede sobrevivir a la acción de los antibióticos?

Las bacterias evitan la acción de los antibióticos por diversos mecanismos. Ya que a veces un simple mecanismo no es eficiente, algunas de estas desarrollan otro mecanismo simultáneo que en combinación resulta ser bastante útil para la supervivencia celular. Los mecanismos pueden ser naturales o desarrollados por la misma bacteria, pero también

pueden ser obtenidos de otras bacterias por transferencia de ADN. Las estrategias para sobrevivir que usan las bacterias y que se conocen hasta el momento han sido descritas por varios investigadores como Cag et al. (2016):

1. Disminución de la incorporación de antibióticos: los antibióticos ingresan a la célula a través de la membrana externa por dos métodos, dependiendo de la estructura del antibiótico: uno es a través de la bicapa lipídica, de la cual está compuesta la membrana celular; el otro es por medio de una especie de poros formados por las proteínas llamadas porinas. Aunque los mecanismos de permeabilidad de la membrana no son completamente entendidos, se han observado diferencias en esta propiedad en bacterias multirresistentes; por ejemplo, en *P. aeruginosa*, donde los antibióticos carbapenémicos entran a través de la porina OprD, se ha observado que en cepas resistentes ha ocurrido una pérdida de la porina, probablemente por una mutación sobre el gen que codifica para la porina OprD.
2. Aumento del eflujo del antibiótico: los sistemas de las bombas de eflujo sacan el antibiótico del interior de la célula, lo que impide que este tenga acción sobre el blanco. Las bombas de eflujo trabajan con un sistema de tres proteínas, donde una de ellas es

la transportadora que usa energía en la forma de una fuerza motriz de protones para transportar drogas y otras sustancias a través de la membrana interna. En bacterias multirresistentes estas proteínas de la bomba de eflujo se encuentran sobreexpresadas o en mayor cantidad que en bacterias sensibles a los antibióticos.

3. Modificación del blanco: las bacterias reemplazan o modifican el blanco de los antibióticos para evitar su daño. Por ejemplo, los antibióticos β -lactámicos inactivan las proteínas de anclaje de penicilinas (PBP), con el fin de alterar la síntesis del peptidoglicano de la pared celular que lleva a la muerte bacteriana, pero bacterias como *S. aureus* resistente producen una enzima homóloga PBP, con baja afinidad por este tipo de antibióticos, siendo capaz de restaurar las funciones vitales y evitando la muerte celular. Otras formas de modificación del blanco incluyen alteración de una subunidad del rARN, metilación de genes ribosomales, proteínas que protegen el blanco y modificaciones postraduccionales.
4. Modificación enzimática de los antibióticos: las bacterias pueden tener enzimas que transforman la estructura de los antibióticos para que estos no tengan efecto. Un ejemplo son las β -lactamasas, que se unen a los antibióticos β -lactámicos, alteran la molécula

y desactivan las propiedades microbianas. Ya que los β -lactámicos son naturales de algunos microorganismos que los usan como mecanismo de defensa, las β -lactamasas existían desde antes de los tratamientos médicos; sin embargo, el mal uso de los antibióticos y la presión que estos generan ha causado la evolución y diseminación de las β -lactamasas, especialmente en bacterias gramnegativas que ahora producen de forma simultánea varias β -lactamasas y las convierte en resistentes a múltiples clases de antibióticos β -lactámicos.

5. Formación de biofilm: el biofilm o la biopelícula es un sistema en el que los microorganismos viven en asociación como una capa delgada sobre una superficie. Los microorganismos dentro del biofilm pueden interactuar entre sí y con el ambiente y para ello secretan polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelular. La matrix del biofilm provee una capa mecánica y bioquímica que proporciona las condiciones necesarias para atenuar la actividad de medicamentos. De hecho, en el 70% de las infecciones crónicas reportadas en humanos en los últimos 15 años, se ha evidenciado la formación de biofilm. Las principales bacterias que forman biofilm son *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, y *K. pneumoniae*. El mecanismo responsable de la formación del biofilm es el





quorum sensing, una forma de comunicación entre bacterias.

Alternativas para reducir la resistencia bacteriana

Analizando el presente y el pasado, se puede decir que los antibióticos dirigidos contra un único blanco son menos exitosos que aquellos dirigidos contra múltiples blancos o contra multisubunidades de una maquinaria macromolecular o estructura.

Es por ello por lo que se debe pensar en estrategias para el descubrimiento de nuevos antibióticos basado en múltiples blancos celulares. Adicionalmente, productos antimicrobianos naturales que se han

optimizado por millones de años de evolución, que están embebidos en la información genómica de varias bacterias, hongos y plantas, son una fuente que se debe estudiar con el fin de encontrar moléculas potenciales para la búsqueda de nuevos antibióticos.

Se debe tener en cuenta que en esos organismos las sustancias antimicrobianas no trabajan solas si no que es una mezcla de moléculas para lograr la complementariedad y sinergia. De hecho, hoy en día, en muchos tratamientos con antibióticos se usa una mezcla de estos con cuatro fines, reportados por Tyers y Wright (2019): primero, para ampliar la probabilidad de eliminar el agente infeccioso si se

desconoce cuál es; segundo, para lograr efectos sinérgicos y así mejorar la eficacia; tercero, para suprimir la emergencia de la resistencia, y cuarto, para minimizar la toxicidad en el huésped. Teniendo en cuenta esto, los métodos para el descubrimiento de nuevos antibióticos incluyen las siguientes estrategias:

1. Acercamientos basados en cultivos: consiste en mostrar la inhibición de una cepa probada sobre una cepa indicadora cultivada cercanamente. El objetivo es determinar qué especies pueden inhibir el crecimiento de otra especie.
2. Descubrimiento de efectos antimicrobianos desde compuestos ya conocidos: debido a que varios millones de compuestos químicos son conocidos y están registrados en bases de datos generales, de productos naturales o de fármacos, estos pueden ser evaluados para determinar su eficacia como antibióticos. Miro-Canturri, Ayerbe-Algaba y Smani (2019) reportan como principal inconveniente de este tipo de metodologías, la selección y la gran cantidad de evaluaciones experimentales que deben realizarse. Para la selección se pueden usar técnicas computacionales que permitan hacer la filtración con el fin de obtener compuestos probables, esos compuestos pueden evaluarse mediante diversas técnicas, como las técnicas microbiológicas y moleculares.
3. Síntesis de nuevas moléculas para mejorar los compuestos ya conocidos: modificar la estructura de una molécula ya conocida que tiene acción antibiótica puede mejorar su eficiencia y evitar la resistencia que algunas bacterias han adquirido contra la molécula original. Un ejemplo de esta estrategia es la propuesta de Saisho et al. (2018), que consiste en la modificación de cefalosporina que condujo al desarrollo de cefiderocol, el cual demostró ser útil para el tratamiento de infecciones urinarias.
4. Búsqueda en los genomas: actualmente hay miles de genomas de procariotes secuenciados y se han generado miles de grupos de genes que pueden codificar para sustancias desconocidas con un posible potencial antimicrobiano, de acuerdo con estudios realizados por Durand, Raoult y Dubourg (2018).
5. Sinergia usando mezclas de antibióticos o productos naturales: la sinergia es el aumento o mejora en la acción de dos sustancias que actúan conjuntamente para lograr una mayor eficiencia. Esas mezclas pueden darse entre antibióticos, entre productos naturales o combinaciones de ellos. También incluso puede ser una combinación de una molécula que tenga actividad con otra que no la tenga, pero que al combinarse mejore su efecto. Para su evaluación se usa el tablero de damas

que consiste en mezclar las dos sustancias a concentraciones por debajo de la letalidad y evaluar el crecimiento de la bacteria.

Estudios genómicos y moleculares para búsqueda de sustancias que inhiban genes asociados con resistencia

La resistencia de un microorganismo frente a un antibiótico impulsa decisiones médicas que llevan al uso de otros antibióticos, lo cual fomenta la presión de selección para el desarrollo de resistencia contra otro antibiótico. Es por ello por lo que Nolte (2014) ha mencionado el interés de realizar estudios orientados a la búsqueda de nuevas alternativas para el control bacteriano que presenten menos efectos adversos; en tal sentido, buscar en sustancias naturales o sintéticas estas características se ha convertido en objeto de estudio para muchos grupos de investigación.

Para evaluar el efecto de estas alternativas farmacológicas es importante conocer a profundidad la fisiología y la estructura de las bacterias y los mecanismos involucrados en la resistencia a los antibióticos y para este han sido de mucho apoyo las herramientas moleculares, genómicas y proteómicas. Entre ellas se pueden citar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), la pirosecuenciación de ADN, la espectrometría de masas, los microarreglos de ADN y la bioinformática. Garza-Ramos, Silva-Sánchez y

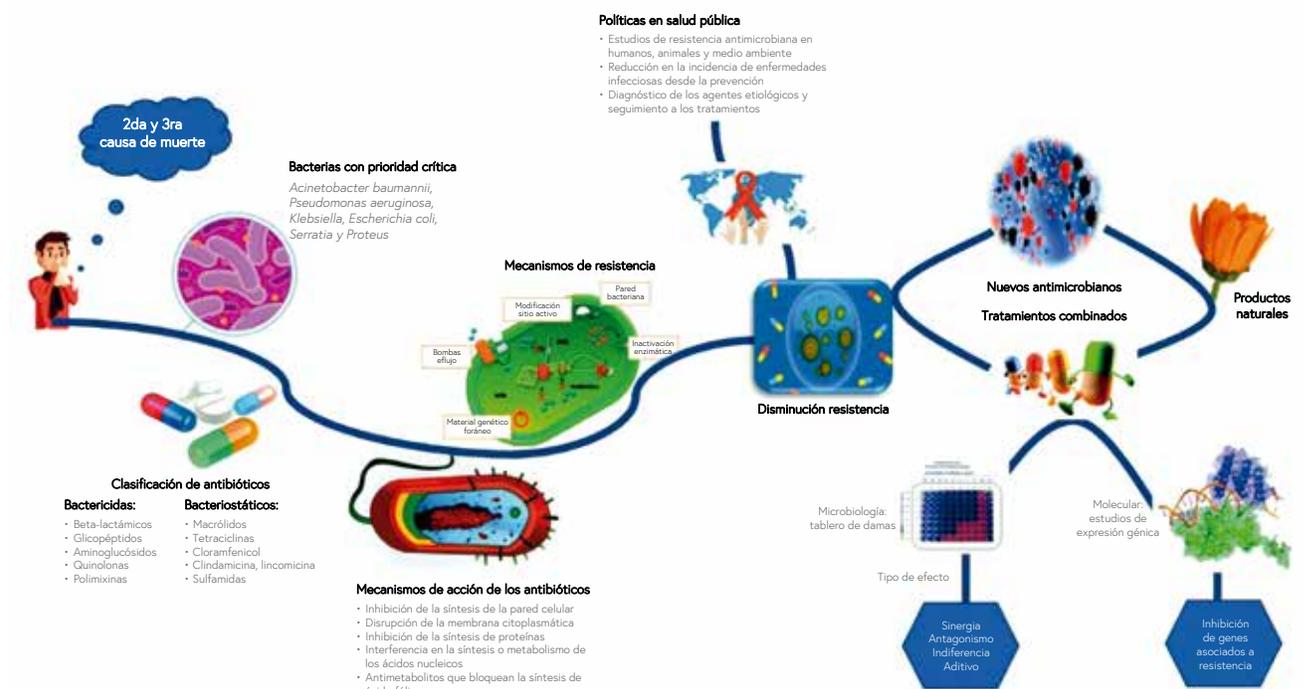
Martínez-Romero (2009) establecen que los estudios con estas herramientas permiten identificar nuevos objetivos para medicamentos y el diseño de antibióticos específicos para precisar los tratamientos frente a las infecciones bacterianas. Igualmente, estas técnicas también facilitan la identificación de los genes que confieren resistencia a los antibióticos e identificar integrones, estructuras genéticas complejas que participan en la propagación de genes que confieren resistencia a múltiples fármacos. Adicionalmente, muchos de los medicamentos cuya base es un péptido han sido aprobados con éxito por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés: Food and Drug Administration). Esto debido a la alta especificidad, selectividad y eficacia que presentan, así como mayor capacidad de penetración y menor acumulación en los tejidos.

Además, estos péptidos antimicrobianos (AMP) son naturalmente abundantes, lo que permite desarrollar moléculas peptídicas semisintéticas con actividad bacteriana y capacidad para limitar los mecanismos de inducción de resistencia de los microbios, como ha sido reportado por Ferri et al. (2017). Actualmente en el grupo de investigación Biomigen de la Universidad de La Salle, en colaboración con el grupo Estudio Químico y de Actividad Biológica de Rutaceae y Myristicaceae Colombianas de la Universidad Nacional de Colombia, se están desarrollando dos proyectos de investigación financiados

por Colciencias y la VRIT sobre la búsqueda de antimicrobianos frente a *P. aeruginosa*. La búsqueda se realiza teniendo como objetivo bloquear el *quorum sensing* y los genes asociados a este proceso. Se están evaluando extractos de productos naturales, compuestos naturales y

medicamentos seleccionados mediante estrategias computacionales con verificación experimental mediante técnicas moleculares y microbiológicas. La finalidad es encontrar sustancias prometedoras y evaluar algunas mezclas que podrían tener efectos sinérgicos sobre la bacteria.

Bacterias resistentes, mecanismos frente a los antibióticos y alternativas de control



Conclusión

La OMS emitió una lista de bacterias con prioridad crítica por presentar resistencia a antibióticos y causar muchas muertes. Por ello la investigación en esta área es fundamental. Con el conocimiento que se tiene de los mecanismos de resistencia se debe buscar y desarrollar

posibles antimicrobianos, principalmente, que actúen en mezclas sinérgicas para tener varios blancos simultáneos y disminuir la posibilidad de generación de resistencia. Si estos antimicrobianos provienen de productos naturales, tienen una mayor probabilidad de éxito debido a que han sido optimizados a lo largo de la evolución.

Bibliografía

- Cag, Y., Caskurlu, H., Fan, Y., Cao, B. y Vahaboglu, H. (2016). Resistance mechanisms. *Annals of Translational Medicine*, 4(17), 326-333. DOI: 10.21037/atm.2016.09.14
- Calvo, J. y Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. DOI: 10.1016/j.eimc.2008.11.001
- Durand, G. A., Raoult, D. y Dubourg, G. (2018). Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(4), 371-382. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010
- Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli, P. y Giaccone, V. (2017). Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2857-2876.
- García, C. A. (2012). Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina. *Acta Médica Peruana*, 29(2), 99-103.
- García, C., Deplano, A., Denis, O., León, M., Siu, H., Chíncha, O., et al. Spread of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to Peru. *The Journal of Infection*, 63(6), 482-483.
- Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, M. y Martínez-Romero, E. (2009). Genetics and Genomics for the study of bacterial resistance. *Salud Pública de México*, 51 (supl. 3), S439-S446.
- Khoshnood, S., Heidary, M., Asadi, A., Soleimani, S., Motahar, M., Savari, M., et al. (2019). A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against *Staphylococcus aureus*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109, 1809-1818. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.131
- Maldonado, N. A., Múnera, M. I., López, J. A., Sierra, P., Robledo, C. y Robledo, J. (2014). Tendencias de la resistencia a antibióticos en Medellín y en los municipios del área metropolitana entre 2007 y 2012: resultados de seis años de vigilancia. *Biomédica*, 34, 433-446.
- Meletis, G., Exindari, M., Vavatsi, N., Sofianou, D. y Diza, E. (2012). Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Hippokratia*, 16(4), 303-307.
- Miró-Canturri, A., Ayerbe-Algaba, R. y Smani, Y. (2019). Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-12. Recuperado <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00041>
- Nolte, O. (2014). Antimicrobial Resistance in the 21st century: a multifaceted challenge. *Protein & Peptide Letters*, 21(4), 330-335. DOI: 10.2174/09298665113206660106
- Saisho, Y., Katsube, T., White, S. y Fukase, H. (2018). Pharmacokinetics, safety, and tolerability of cefiderocol, a novel siderophore cephalosporin for gram-negative bacteria, in healthy subjects. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 62(3), 1-12.
- Tyers, M. y Wright, G. D. (2019). Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 141-155. DOI: 10.1038/s41579-018-0141-x