

RESISTENCIA BACTERIANA A QUINOLONAS: DETERMINANTES CODIFICADOS EN PLÁSMIDOS*

Víctor M. Chávez-Jacobo¹, Martha I. Ramírez-Díaz¹,
Jesús Silva-Sánchez² y Carlos Cervantes^{1**}

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Morelia, Michoacán; ² Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública; Cuernavaca, Morelos. **Autor para correspondencia a correo E: cvega1999@yahoo.com

RESUMEN

Las quinolonas, un grupo de antibióticos sintéticos, han generado un considerable interés tanto científico como clínico. El mecanismo de acción de las quinolonas consiste en la inhibición de las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV. Las primeras bacterias resistentes a quinolonas estudiadas contenían mutaciones en los genes cromosómicos que codifican a dichas enzimas. De manera inesperada, recientemente se identificaron determinantes de resistencia a quinolonas en varios plásmidos. Las propiedades de estos determinantes se analizan brevemente en esta revisión.

PALABRAS CLAVE:

Antibióticos, topoisomerasas, plásmidos.

ABSTRACT

Quinolones, a group of synthetic antibiotics, have generated significant interest both in scientific and clinical grounds. The mechanism of action of quinolones consists in the inhibition of the enzymes DNA gyrase and topoisomerase IV. The first quinolone-resistant bacteria studied had mutations in chromosomal genes encoding those enzymes. Unexpectedly, several plasmid-encoded quinolone resistance determinants have been identified recently. The properties of these determinants are briefly analyzed in this review.

KEY WORDS:

Antibiotics, topoisomerases, plasmids.

1. INTRODUCCIÓN

El inicio de cinco décadas de desarrollo y uso de los antibióticos sintéticos denominados quinolonas está marcado por el descubrimiento del ácido nalidíxico, molécula derivada de la 1,8-naftiridina, y su introducción en 1967 para uso clínico en el tratamiento de infecciones del tracto urinario ocasionadas por bacterias Gram-negativas (5). Las quinolonas han sido el centro de un considerable interés, tanto científico como clínico, debido a que ofrecen muchos de los atributos de un antibiótico ideal: alta potencia, amplio espectro de acción, buena biodisponibilidad, formulaciones orales e intravenosas, altos niveles en suero, un amplio volumen de distribución y baja incidencia de efectos adversos (3). Como ha ocurrido con todos los antibióticos empleados en el tratamiento de

infecciones bacterianas, en el caso de las quinolonas también se han detectado microorganismos resistentes a estos antibióticos. Las bacterias han desarrollado variados e ingeniosos mecanismos de tolerancia a estas drogas, codificados tanto en genes cromosómicos como en genes de plásmidos. Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos de ADN que están presentes en la mayoría de las bacterias. Los plásmidos con frecuencia se pueden transferir de una célula bacteriana a otra. Los plásmidos comúnmente poseen genes que codifican propiedades adaptativas que les permiten a las bacterias sobrevivir en condiciones ambientales adversas, como la presencia de antibióticos y de otros compuestos nocivos. En esta revisión se describirán brevemente los determinantes bacterianos de resistencia a quinolonas presentes en plásmidos.

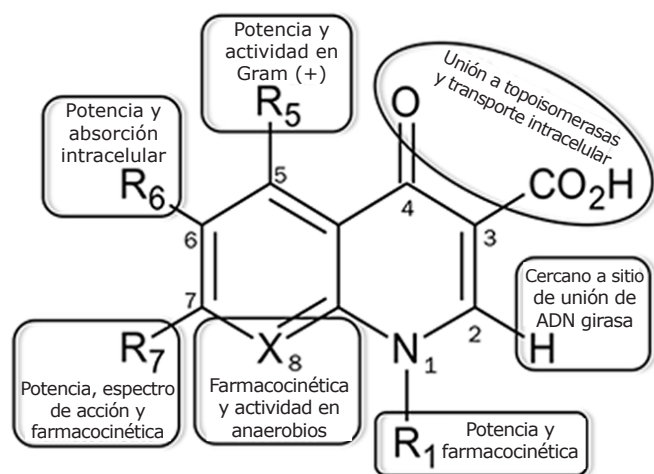


Figura 1. Estructura base de las quinolonas y funciones de los sustituyentes. Los grupos R representan las posiciones sustituidas comúnmente. Se indican los principales procesos en los que participan las modificaciones en cada posición. Las moléculas donde la posición 8 se sustituye por un átomo de carbono son quinolonas y cuando se sustituye por un átomo de nitrógeno son naftiridinas. Modificada de (2).

2. DESARROLLO DE LAS QUINOLONAS

A lo largo del tiempo se han hecho diversas modificaciones al núcleo naftiridina del ácido nalidíxico, considerado la estructura base (Fig. 1), las cuales han incrementado el espectro antimicrobiano y la potencia y mejorado la biodisponibilidad de los nuevos fármacos. Así, las quinolonas se consideran antibióticos eficaces y seguros para el tratamiento de infecciones bacterianas (2). Una de las primeras modificaciones a la estructura base fue la adición de un átomo de flúor en la posición 6 (Figura 1), la cual incrementó más de 10 veces su potencia; tal modificación estabiliza la unión del antibiótico con su sitio blanco al influir en la distribución de cargas de la molécula. Otras modificaciones se han realizado en las distintas posiciones del núcleo básico, ampliando el espectro de acción de las quinolonas hacia bacterias Gram positivas y microorganismos anaerobios (10) (Fig. 1). La Figura 2 muestra las etapas de desarrollo de las distintas quinolonas y las estructuras químicas de algunos de los antibióticos representativos del grupo.

3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS

Para ejercer sus efectos antimicrobianos, las quinolonas son primero transportadas al interior de la célula bacteriana mediante un proceso de difusión simple. El mecanismo de acción de estos antibióti-

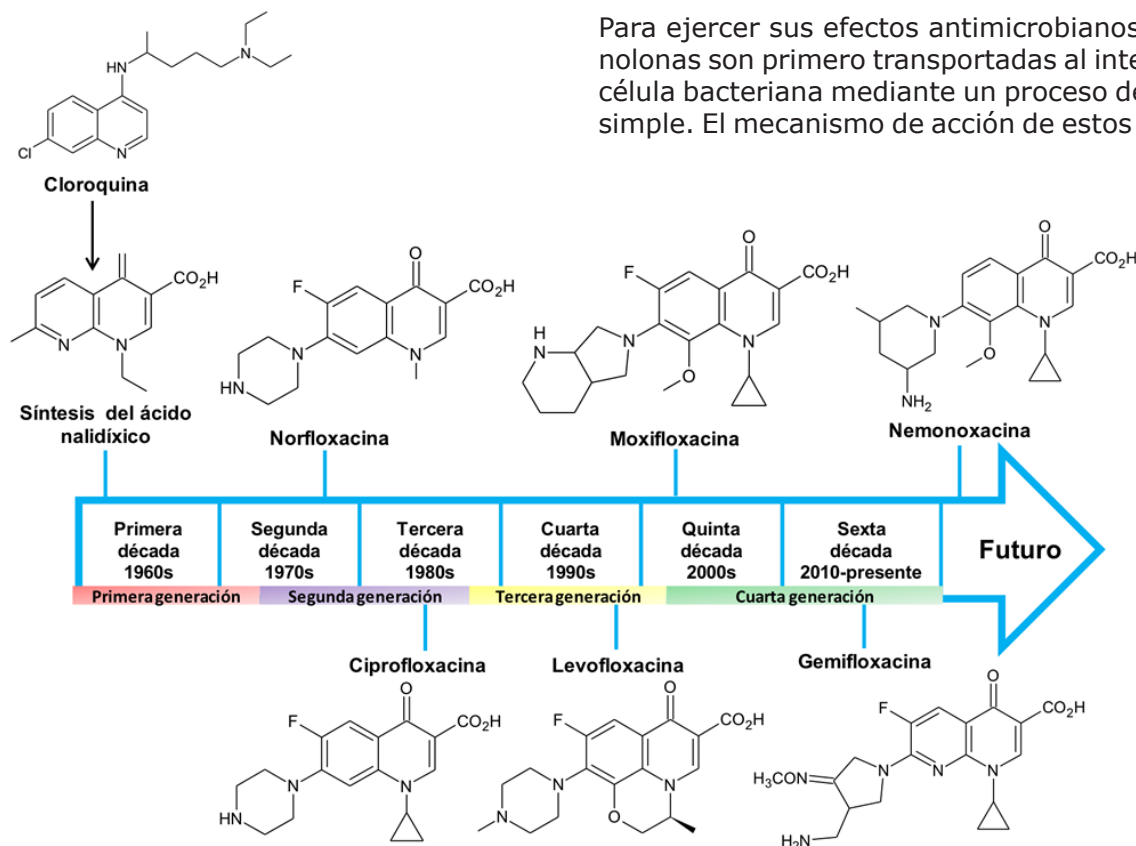


Figura 2. Etapas de desarrollo de las quinolonas. Se muestran las cuatro generaciones de quinolonas a través de casi seis décadas, desde la síntesis del ácido nalidíxico (1962) hasta el desarrollo de la nemonoxacina (2014). Se presentan las estructuras químicas de quinolonas representativas de las distintas etapas. Modificada de (5).

cos consiste en la inhibición de dos enzimas clave para la replicación, transcripción y reparación del ADN de la célula bacteriana: la ADN topoisomerasa II o ADN girasa y la ADN topoisomerasa IV (4). Estas enzimas pertenecen a la familia de topoisomerasas tipo IIA y están compuestas cada una de dos subunidades: GyrA y GyrB para la ADN girasa, ParC y ParE para la topoisomerasa IV (Fig. 3). Ambas enzimas contribuyen al desenrollamiento del ADN que se requiere para que éste pueda ser procesado, pero funcionan de diferente manera: la girasa remueve superenrollamientos positivos y avanza delante de la horquilla de replicación, mientras que la topoisomerasa IV introduce superenrollamientos positivos avanzando detrás de la horquilla de replicación; esta enzima, además, participa en la segregación de los cromosomas posterior a la división celular (8).

Las topoisomerasas tipo IIA introducen un par de cortes en la cadena sencilla de ADN, uniéndose covalentemente al extremo 5' formando el complejo ADN-topoisomerasa (Fig. 3), lo cual relaja el superenrollamiento de la doble hélice. Las quinolonas se unen al complejo, atrapando a la topoisomerasa en el ADN, lo que da como resultado la inhibición de la replicación. Este nuevo complejo ternario, ADN-Topoisomerasa-Quinolona (Fig. 3), bloquea el movimiento de la horquilla de replicación y de los complejos transcripcionales, inhibiendo el crecimiento bacteriano y causando eventualmente la muerte celular (9).

4. RESISTENCIA BACTERIANA A QUINOLONAS

Debido al origen sintético de las quinolonas, se consideró inicialmente que el único mecanismo de resistencia que las bacterias podrían adquirir serían las mutaciones en los genes que codifican a las proteínas blanco, las topoisomerasas tipo IIA, o a los transportadores de membrana, que expulsan compuestos tóxicos del citoplasma. En cuanto a la adquisición de resistencia mediante la transferencia de genes plasmídicos, se consideró que no sería posible, ya que el origen de los genes que confieren resistencia a antibióticos no-sintéticos generalmente radica en los propios microorganismos que los producen (7). En los últimos años se ha encontrado, sin embargo, que los sistemas de resistencia codificados en plásmidos representan una importante fuente de mecanismos bacterianos novedosos capaces de contrarrestar el efecto nocivo de las quinolonas. El análisis de los genes y proteínas relacionados con la resistencia a quinolonas sugiere que éstos surgieron mucho tiempo antes del uso de dichos antibióticos.

Los sistemas de resistencia a quinolonas pueden

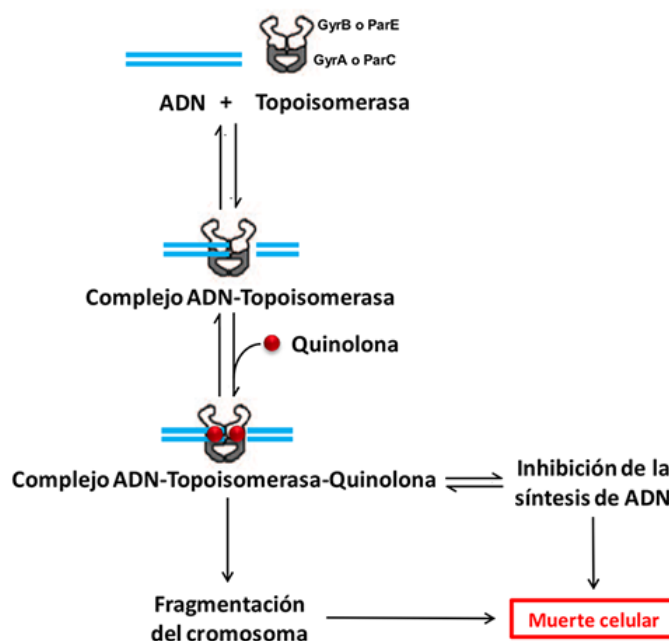


Figura 3. Mecanismo de acción de las quinolonas. Para relajar el ADN superenrollado y permitir que el ADN pueda ser procesado, las topoisomerasas introducen cortes en la molécula. La formación del complejo ADN-Topoisomerasa-Quinolona inhibe la replicación del ADN, impidiendo que los cortes en la doble hélice sean resellados, y el cromosoma se fragmenta; ambas situaciones pueden conducir a la muerte celular. Modificada de (4).

dividirse en dos grupos (1) (Fig. 4): i) los que están codificados en genes cromosómicos, que incluyen las modificaciones en los sitios blanco del antibiótico y los sistemas de expulsión; y ii) los codificados por genes presentes en plásmidos, que incluyen a las proteínas Qnr, la enzima aminoglucósido acetil transferasa modificada y los sistemas membranales de expulsión. Los sistemas plasmídicos se analizarán a continuación.

5. RESISTENCIA A QUINOLONAS DETERMINADA POR GENES PLASMÍDICOS

5.1. Proteínas Qnr

Las proteínas Qnr se identificaron por primera vez en el plásmido pMG252, aislado de una cepa clínica de la enterobacteria *Klebsiella pneumoniae* resistente a ciprofloxacina. En esta bacteria se identificó una proteína de 219 aminoácidos, QnrA, que confiere resistencia a quinolonas (12). Las proteínas Qnr pertenecen a la familia de pentapéptidos repetidos, llamada así porque sus miembros contienen un motivo recurrente de cinco aminoácidos en tándem

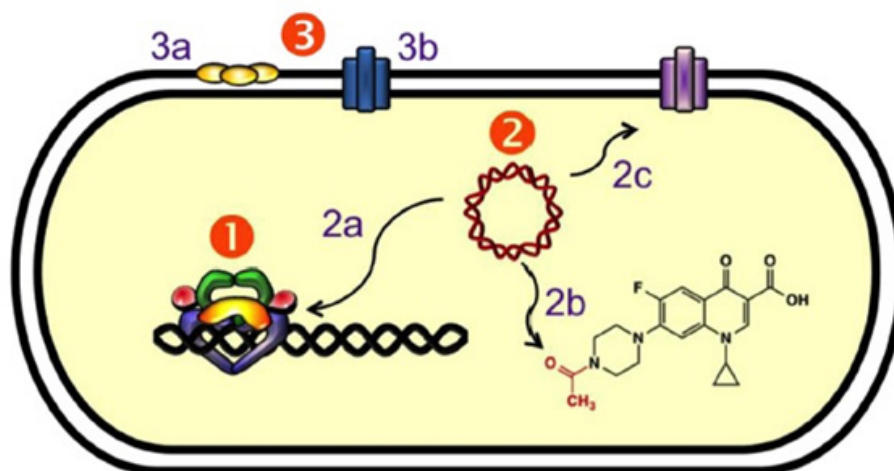


Figura 4. Sistemas de resistencia a quinolonas. Se representa una célula bacteriana mostrando los distintos sistemas de resistencia; los detalles se describen en el texto. (1) Resistencia mediada por mutaciones en los genes de las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV, que disminuyen la unión del antibiótico. (2) Resistencia mediada por genes plasmídicos: (2a) Proteínas Qnr (en amarillo), que inhiben la unión de la quinolona al complejo ADN-topoisomerasa; (2b) La enzima AAC(6')-Ib-cr, que acetila algunas quinolonas reduciendo su efectividad; (2c) Sistemas membranales de expulsión, que disminuyen la concentración intracelular de las quinolonas. (3) Resistencia mediada por genes cromosómicos: (3a) Disminución de la expresión de porinas, que limita el ingreso del antibiótico; (3b) Sistemas de expulsión. Modificada de (1).

[Ser, Thr, Ala o Val] [Asp o Asn] [Leu o Phe] [Ser, Thr o Arg] [Gly] (12). Aunque se han identificado en los distintos genomas bacterianos más de 500 secuencias que contienen el motivo pentapéptido repetido, se desconoce la función de casi todas ellas. Las secuencias que codifican proteínas Qnr se encuentran ampliamente distribuidas en los genomas de enterobacterias. Además de QnrA, se han estudiado las proteínas QnrB, también de *K. pneumoniae*, y QnrS, de *Shigella flexneri*. Aunque se sabe que estas proteínas se unen al complejo ADN-Topoisomerasa, impidiendo la unión de las quinolonas (Fig. 4), no se conoce con detalle su mecanismo de acción.

5.2 Modificación enzimática de las quinolonas

Un sistema de modificación química de quinolonas, codificado en el plásmido pSH10-2, se identificó en una cepa clínica de *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacina (11). Mediante mutagénesis por transposición se encontró que pSH10-2 codifica a la proteína AAC(6')-Ib-cr, cuya secuencia muestra similitud con las aminoglucósido acetil transferasas, enzimas que confieren resistencia a antibióticos del grupo de los aminoglucósidos por medio de su acetilación y consecuente inactivación. El análisis de la secuencia de esta enzima reveló que se encuentra modificada en los aminoácidos 102 (Trp → Arg) y 179 (Asp → Tyr), con respecto a las aminoglucósido acetil transferasas; la mutagénesis dirigida a los

codones correspondientes mostró que, en ausencia de dichos cambios, la proteína no se asocia con la resistencia a quinolonas. Así, las mutaciones causaron un cambio drástico en la especificidad de sustrato en la enzima AAC(6')-Ib-cr. Mediante ensayos de acetilación con ciprofloxacina como sustrato, se confirmó que la enzima introduce un acetilo en el nitrógeno del grupo piperazina en la posición 6 del antibiótico (Fig. 1); la modificación reduce la afinidad de esta quinolona por las topoisomerasas (Fig. 4), originando la resistencia.

5.3 Sistemas de expulsión

A la fecha se han identificado dos plásmidos, pHPA y pOLA52, que confieren resistencia a quinolonas mediante sistemas membranales de expulsión, los cuales causan una disminución de la concentración intracelular del fármaco (Fig. 4).

El plásmido pHPA, aislado de una cepa clínica de *E. coli* codifica a la proteína de membrana interna QepA, la cual se agrupa en la superfamilia de transportadores MFS. Esta proteína confiere resistencia mediante la expulsión del citoplasma de quinolonas hidrofílicas como ciprofloxacina y norfloxacina (Fig. 2).

Por otra parte, el plásmido pOLA52, proveniente de una cepa de *E. coli* aislada de estiércol de cerdos, codifica a OqxA, una proteína de membrana interna perteneciente a la familia de transportadores RND, y a OqxB, una proteína del periplasma (6).

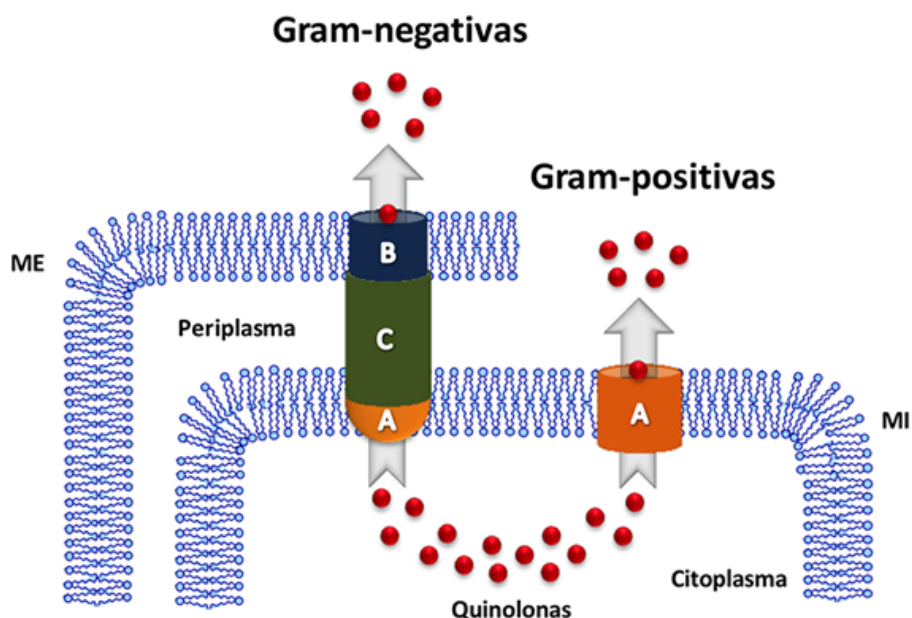


Figura 3. *Sistemas bacterianos de expulsión. Se muestra esquemáticamente el funcionamiento de un complejo tripartita de expulsión. A) Proteína de la membrana interna (MI), que une a la quinolona (esferas de color rojo) en el citoplasma. B) proteína de la membrana externa (ME), que expulsa al antibiótico al exterior de la célula. C) Proteína del periplasma, que conecta a los dos componentes membranales. En la parte superior se señala el tipo de bacteria donde se encuentra cada sistema de expulsión.*

Las proteínas OqxAB confieren resistencia a ácido nalidíxico y ciprofloxacina; el hallazgo de que son capaces de expulsar al colorante bromuro de etidio, sugiere que la resistencia a quinolonas también está dada por su expulsión del citoplasma. Para conferir resistencia a quinolonas, OqxA y OqxB requieren de un componente adicional de la membrana externa, la proteína TolC, por lo que funcionan como un complejo tripartita de expulsión, OqxAB-TolC, similar a algunos sistemas codificados por genes cromosómicos (Fig. 5).

6. CONSIDERACIONES FINALES

La historia de las quinolonas abarca más de 50 años, período en el cual se ha desarrollado una gran variedad de moléculas con actividad antimicrobiana. Sin embargo, de manera paralela al desarrollo de nuevas quinolonas, el número de bacterias resistentes ha ido en aumento. No obstante, la ciprofloxacina,

con más de 30 años de uso, continúa siendo un fármaco de primera elección en el tratamiento de infecciones por enterobacterias.

A pesar de que se han descrito varios mecanismos de resistencia a quinolonas, la forma más común de resistencia es la causada por mutaciones específicas en los genes de la ADN girasa y de la topoisomerasa IV. Como se describió en este trabajo, los determinantes de resistencia codificados en plásmidos representan una fuente continua de mecanismos evolutivos de las bacterias que les permiten contrarrestar el efecto tóxico de las quinolonas.

Agradecimientos

Trabajo realizado con apoyos de la Coordinación de Investigación Científica (UMSNH, No. 2.35) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 181747).



REFERENCIAS

1. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N (2014) Mechanisms of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53:1565-1574.
2. Andersson MI, MacGowan AP (2003) Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother* 51:1-11.
3. Bolon M K (2011) The newer fluoroquinolones. *Med Clin North Am* 95:793-817.
4. Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X (2009) Quinolones: actions and resistance updated. *Curr Top Med* 9:981-998.
5. Emmerson AM, Jones AM (2003) The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother* 51:13-20.
6. Hansen LH, Johannesen E, Burmolle M, Sorensen AH, Sorensen SJ (2004) Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3332-3337.
7. Hernández A, Sánchez MB, Martínez JL (2011) Quinolone resistance: much more than predicted. *Front Microbiol* 2:1-6.
8. Hiasa H, Shea ME (2000) DNA Gyrase-mediated wrapping of the DNA strand is required for the replication fork arrest by the DNA Gyrase-Quinolone-DNA ternary complex. *J Biol Chem* 275:34780-34786.
9. Kampranis SC, Maxwell A (1998) The DNA Gyrase-Quinolone complex: ATP hydrolysis and the mechanism of DNA cleavage. *J Biol Chem* 273:22615-22626.
10. Peterson LR (2001) Quinolone molecular structure-activity relationships: What we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin Infect Dis* 33:180-186.
11. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Buch K, Hooper DC (2006) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12:83-88.
12. Vetting MW, Hegde SS, Fajardo JE, Fiser A, Roderick SL, Takiff HE, Blanchard JS (2006) The pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* 45:1-10.