

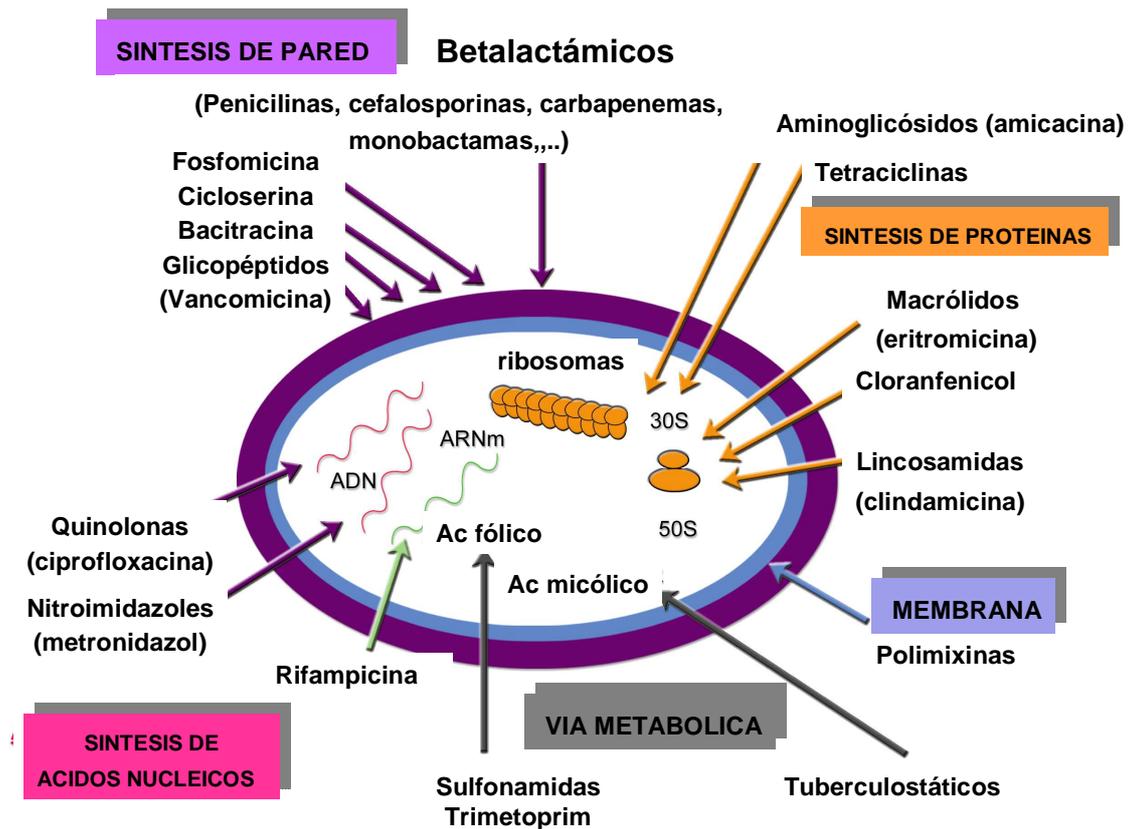
3. Bases genéticas de la resistencia a los antimicrobianos.

Antibacterianos

Alexander Fleming descubrió el primer antibiótico, la **penicilina**, en 1929. Esta sustancia es producida por el hongo *Penicillium notatum* y demostró ser capaz de inhibir el crecimiento in vitro de los estafilococos que Fleming cultivaba en su laboratorio. Una vez purificada, y comprobado que servía para curar infecciones en animales, comenzó a emplearse con gran éxito para tratar enfermedades infecciosas humanas. Tras este descubrimiento muchos investigadores buscaron microorganismos capaces de producir otras sustancias naturales con efecto antibacteriano. **Waksman** y sus discípulos estudiaron microorganismos del suelo y así descubrieron hongos y bacterias filamentosas (actinomicetos) capaces de sintetizar varios antibióticos de interés como la estreptomicina, el cloranfenicol o la eritromicina, entre otros.

En todo caso entre las muchas sustancias antimicrobianas que se han encontrado en la naturaleza solo unas pocas moléculas tienen **valor terapéutico**, porque para tratar enfermedades infecciosas humanas deben inhibir el crecimiento de la bacteria causante a concentraciones que no resulten tóxicas para el paciente. Esta **toxicidad selectiva** está relacionada con su **mecanismo de acción**. Si el antibiótico afecta a una estructura o proceso común a la bacteria y a las células humanas (la membrana citoplásmica por ejemplo) será demasiado tóxico para ser utilizado por vía sistémica. Por el contrario si afecta a una estructura exclusiva de la célula bacteriana, no será tóxico para nuestras células. Por eso son muy utilizados los antibióticos betalactámicos (penicilina, cefalosporinas,..) que inhiben la síntesis de la pared de peptidoglicano, una sustancia esencial para la supervivencia de las bacterias pero que no está presente en la célula eucariota.

Basándose en su **naturaleza química** se agrupan en **familias** las sustancias con una estructura básica común: betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, etc. Otra forma de clasificarlos es atendiendo a la **estructura o proceso diana afectada** por cada sustancia. Así tenemos antibióticos que **inhiben la síntesis de la pared** bacteriana, que destruyen su **membrana**, que bloquean la **síntesis protéica** en los ribosomas procariontes, que inhiben la replicación de los **ácidos nucleicos** de la bacteria o que afectan a alguna **vía metabólica** exclusiva de las bacterias (figura 3.1.).



3.1. figura: Dianas de algunas familias de antibióticos.

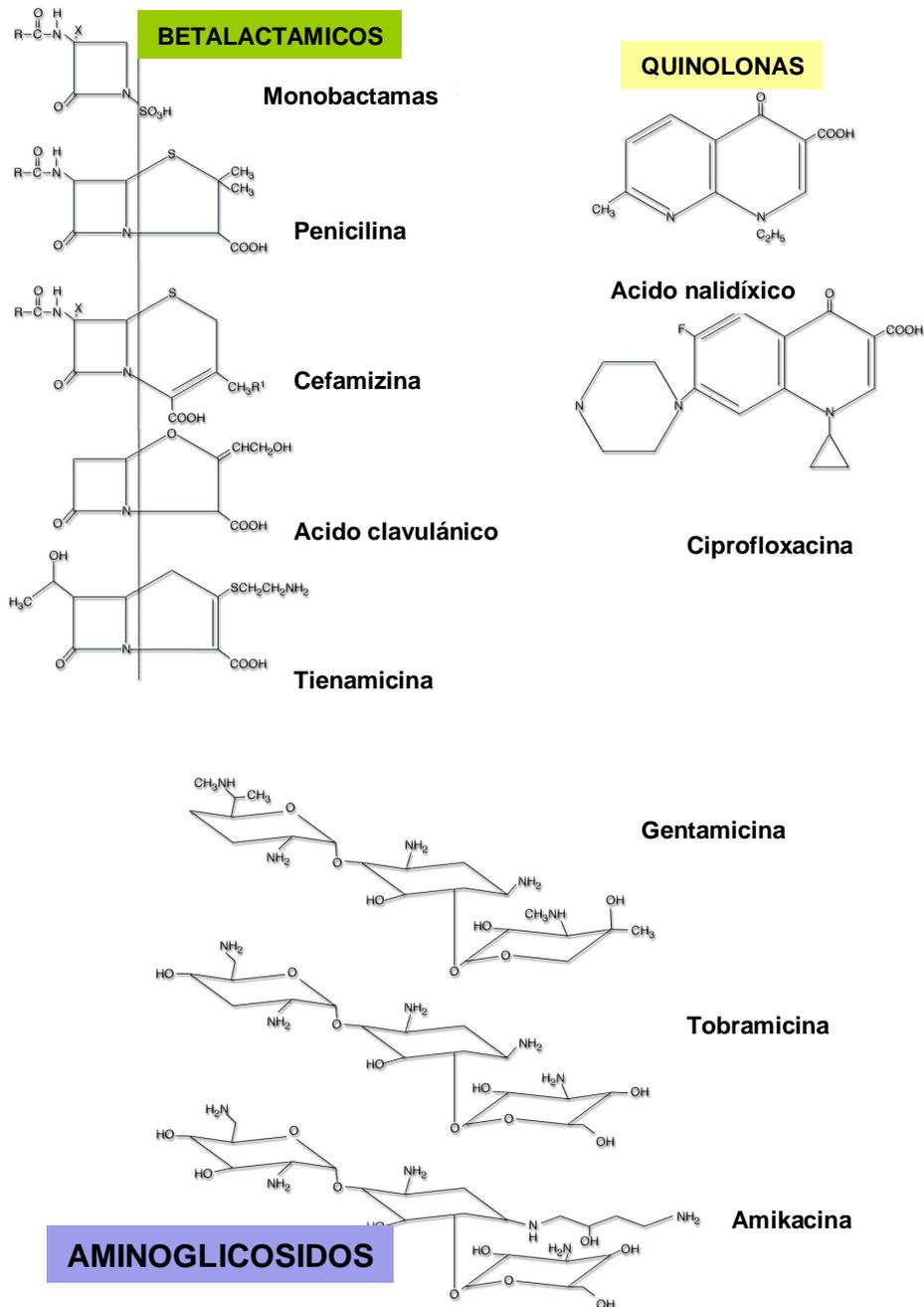
1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared.

La formación de nuevas moléculas de peptidoglicano, esencial para el crecimiento de la pared, puede ser bloqueada en diferentes etapas:

Los **betalactámicos** son análogos de la D-alanil-D-alanina y bloquean el último paso de la síntesis de peptidoglicano, la formación de uniones interpeptídicas. Dentro de esta gran familia se diferencian cuatro grupos. Las **penicilinas naturales** producidas por el hongo *Penicillium* fueron muy eficaces contra bacterias Gram positivas, pero hoy en día la mayoría de los *Staphylococcus* producen una penicilinasa que les hace resistentes a este grupo. Tienen un espectro de acción más amplio las **penicilinas semisintéticas**. La ampicilina sigue empleándose en muchas infecciones por Gram negativos. A veces se asocia al ácido clavulánico que no es un antibiótico sino un inhibidor de muchas betalactamasas (enzimas que confieren resistencia a antibióticos betalactámicos). Las **cefalosporinas son producidas por el hongo *Cephalosporium***, y aunque tienen el mismo mecanismo de acción que las penicilinas, son más estables frente a muchas betalactamasas, lo que amplía su espectro de actividad. Pero también existen bacterias productoras de cefalosporinasas. Los **monobactámicos** son también betalactámicos y pueden emplearse en pacientes con alergia a penicilina y cefalosporina.

La **cicloserina** es análogo de la D-alanina e inhibe la formación de unidades de peptidoglicano pero su toxicidad restringe mucho su uso.

Los **glucopéptidos** como la **vancomicina** inhiben el proceso de transpeptidación durante el montaje del peptidoglucano. Son la alternativa para tratar infecciones por *S.aureus* resistente a los betalactámicos.



3.2.figura: Estructura química de algunas familias de antibióticos: betalactámicos y quinolonas (arriba) y aminoglicósidos (abajo).

2. Antibióticos que destruyen las membranas

Las **polimixinas** producidas por *Bacillus polymixis* destruyen la estructura de membrana procariota pero debido a la gran semejanza estructural de todas las membranas también resultan **tóxicos** para la célula eucariota y no pueden emplearse por vía sistémica.

3. Antibióticos que detienen la síntesis proteica en las células procariotas

La síntesis de proteínas bacterianas tiene lugar en ribosomas procariotas 70S con subunidades 50S y 30S. Por eso varias sustancias capaces de unirse a una u otra de estas subunidades bloquean la síntesis de proteínas de la bacteria sin afectar a la de las proteínas del huésped, que se realiza en ribosomas 80S. Es el caso de los aminoglicósidos o de los macrólidos.

Los **aminoglicósidos** (estreptomycina, kanamicina, tobramicina, gentamicina,..) son en principio sustancias naturales producidos por especies bacterianas del suelo como *Streptomyces* o *Micromonospora*. Se unen a la **subunidad 30S** del ribosoma impidiendo el primer paso de la síntesis de proteínas. Se emplean tanto contra bacterias Gram positivas como contra Gram negativas.

Las **tetraciclinas** (tetraciclina, clorotetraciclina y doxiciclina) son antibióticos semisintéticos o totalmente de síntesis química. Inhiben la síntesis de proteínas tanto en procariotas como en eucariotas, pero logran su toxicidad selectiva porque las bacterias tienen sistemas específicos para introducirlas de forma que en su citoplasma se logran altas concentraciones sin que esto mismo ocurra en las células del huésped. Aunque la extensión de genes de resistencia a tetraciclinas limita hoy en día su utilización, aún siguen empleándose para infecciones causadas por espiroquetas y clamidias.

El **cloranfenicol** es un antibiótico polipeptídico que inhibe la elongación de las proteínas en formación bloqueando la peptidil-transferasa en los ribosomas 70S. Aunque de amplio espectro antibacteriano sus **efectos secundarios** indeseados hacen que su uso sea muy limitado.

Los **macrólidos** se unen a la subunidad 50S y también impiden la elongación de la proteína. Son bactericidas para las Gram positivas y bacteriostáticos para Gram negativas. Las **lincosamidas (clindamicina)** tienen un mecanismo similar y se emplean contra bacterias anaerobias Gram negativas.

4. Antibióticos que impiden la replicación de ácidos nucleicos en procariotas

Las **quinolonas** inhiben la acción de la **ADN girasa** bacteriana que es imprescindible para el superenrollamiento de las dobles hélices de ADN. La primera quinolona encontrada, el **ácido nalidíxico**, era útil únicamente para tratar **infecciones urinarias**. Pero los derivados fluorados o **fluoroquinolonas** son antibacterianos de amplio espectro. Se emplean frente a bacterias intracelulares y contra algunas Gram positivas.

La **rifampicina** inactiva la **ARN polimerasa** dependiente de ADN, bloqueando así la formación de los ARN mensajeros. Se usa contra Gram positivas, incluida *Mycobacterium tuberculosis*, y también contra algunas Gram negativas.

Los **nitroimidazoles**, de los que el más utilizado es el **metronidazol**, son eficaces contra bacterias anaerobias y también contra protozoos. Una vez dentro del citoplasma de los anaerobios son reducidos por una proteína transportadora de electrones y se convierten en sustancias activas capaces de romper cadenas de ADN. En nuestras células el metronidazol no sufre tal reducción y por esa razón no es tóxico para el huésped.

5. Antibióticos que influyen en procesos metabólicos procariotas

Las **sulfamidias**, el trimetoprim y otros quimioterápicos de síntesis, inhiben la síntesis de ácido fólico. Nosotros no sintetizamos este producto sino que lo obtenemos preformado en la dieta. Tuberculostáticos como las **isoniacidas** y el **etambutol**, impiden la síntesis de ácido micólico que solo se encuentra en la pared de las micobacterias causantes de la enfermedad.

Resistencia adquirida a los antibacterianos

Algunas especies de bacterias patógenas son **resistentes** de forma **natural** a varios antibióticos. Es el caso de las bacterias Gram negativas que debido a la barrera selectiva que supone su membrana externa, son resistentes a antibióticos que resultan eficaces frente a Gram positivas.

Pero en muchos casos, poblaciones de bacterias pertenecientes a una especie naturalmente sensible a un antibiótico **adquieren resistencia** al mismo. La resistencia puede adquirirse por **mutaciones** en genes cromosómicos que afecten al mecanismo de acción del fármaco, o por la incorporación de elementos genéticos con genes que proporcionen resistencia, como **plásmidos o trasposones** que pueden provenir de otras especies bacterianas.

Cualquier sustancia antibiótica para ser efectiva tiene que entrar en la bacteria y enlazar la estructura o vía metabólica diana de su actividad. Por eso hay varios mecanismos que conducen a la resistencia y que a veces ocurren simultáneamente en una misma bacteria.

1. Una **permeabilidad disminuída o un sistema de reflujo** activo (sale mas antibiótico del que entra) conducen a la resistencia porque no se alcanzan en el interior de la bacteria las concentraciones mínimas de antibiótico que son eficaces. Los antibióticos hidrosolubles por ejemplo entran en las bacterias Gram negativas a través de las porinas de la membrana externa. Las mutaciones que conducen a la síntesis de **porinas** mas estrechas, o a un menor nº de porinas, confieren resistencia a estos antibióticos. La resistencia a tetraciclina está mediada por genes plasmídicos que codifican proteínas capaces de sacar la tetraciclina a mayor velocidad de la que penetra de forma que no se alcanza nunca una concentración tóxica para la bacteria.

2. El antibiótico puede también ser **inactivado por determinados enzimas** antes de alcanzar su diana u objetivo. Entre los enzimas inactivantes los mas importantes son las **betalactamasas** que hidrolizan el anillo betalactámico de forma que el antibiótico pierde su actividad. Se han descubierto muchos tipos de betalactamasas con espectros de inactivación mas o menos amplios (penicilinasas, cefalosporinasas, betalactamasas de amplio espectro). Algunas están codificadas en el cromosoma y otras en plásmidos o en trasposones. Estas últimas, debido al amplio uso de los antibióticos betalactámicos se están extendiendo en los últimos años a través de muchas poblaciones de bacterias patógenas.

Hay varios tipos de enzimas que **modifican los antibióticos aminoglucósidos** y proporcionan a la bacteria que los posee resistencia a los mismos: **acetilasas, fosforilasas y adenilasas**. Los genes que codifican dichas enzimas se han extendido entre especies Gram negativas patógenas a través de plásmidos y trasposones.

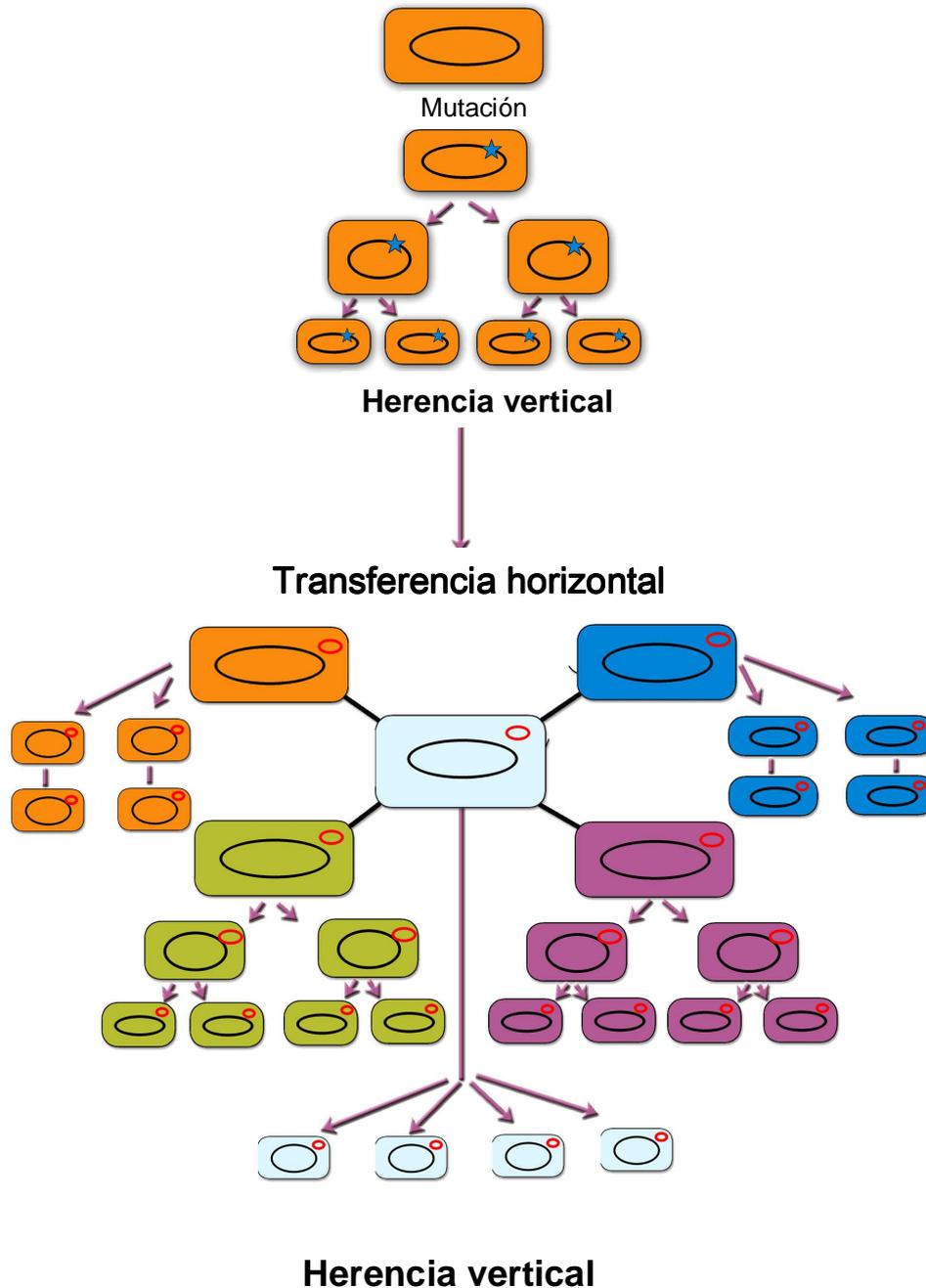
3. En otros casos la resistencia se debe a que **la estructura diana** del antibiótico sufre un cambio que **disminuye su afinidad por el antibiótico**. Los betalactámicos para actuar se fijan en unas proteínas de la pared bacteriana denominadas PBP (peniciling binding proteins). Algunas bacterias alcanzan progresivamente resistencia a betalactámicos al acumular mutaciones que afectan a la afinidad de sus PBPs por el antibiótico. La resistencia a quinolonas puede ocurrir amenudo por mutaciones que afectan a la ADN girasa, que es la estructura diana de este grupo de antibióticos. Mutaciones que afectan a proteínas ribosómicas conducen también a resistencia a tetraciclinas, aminoglucósidos o cloranfenicol.

4. Cuando el antibiótico actúa inhibiendo un proceso **metabólico** esencial para la bacteria la consecución del producto por **vías alternativas** conduce a resistencia. Las bacterias resistentes a sulfamidas por ejemplo sintetizan el folato por vías alternativas a la inhibida por estos fármacos.

La resistencia producida por una sola mutación puede no tener por si misma repercusión clínica, pero a medida que **se acumulan mutaciones** que afectan a la misma estructura, o bien **se combinan varios mecanismos de resistencia** a un mismo antibiótico en una bacteria se puede alcanzar el nivel crítico de resistencia. Por otra parte y sobre todo a través de la adquisición de plásmidos y trasposones, una bacteria puede adquirir de golpe genes que le confieran **resistencia a grupos diferentes de antibióticos** que son vehiculados por un mismo elemento transferible.

Extensión de la resistencia.

Las resistencias adquiridas por mutación son **heredadas verticalmente** por la población descendiente de la bacteria mutada (figura 3.3.). No hay que olvidar que las bacterias mutadas solo sustituyen a las sensibles cuando en su entorno está presente el antibiótico que las selecciona, de forma que es el propio uso de los antibióticos el que conduce a la extensión de estas resistencias.



3.3. figura: Extensión de la resistencia a los antibióticos

Los genes que codifican betalactamasas, otros enzimas inactivantes o mecanismos activos de reflujo pueden estar en plásmidos. Los plásmidos conjugativos poseen la capacidad de autotransferirse por conjugación y también de movilizar otros plásmidos mas pequeños (no conjugativos). También pueden ser transducidos por bacteriofagos. Esta **extensión de genes de resistencia es horizontal** entre bacterias de la misma o diferente especie, **y también vertical** porque el plásmido es generalmente heredado por la progenie de la bacteria que lo adquirió. Por eso cuando las resistencias se encuentran en **elementos transferibles horizontalmente** como plásmidos y trasposones, una vez introducidos en un entorno, su extensión entre las diversas poblaciones de bacterias patógenas es rapidísima.

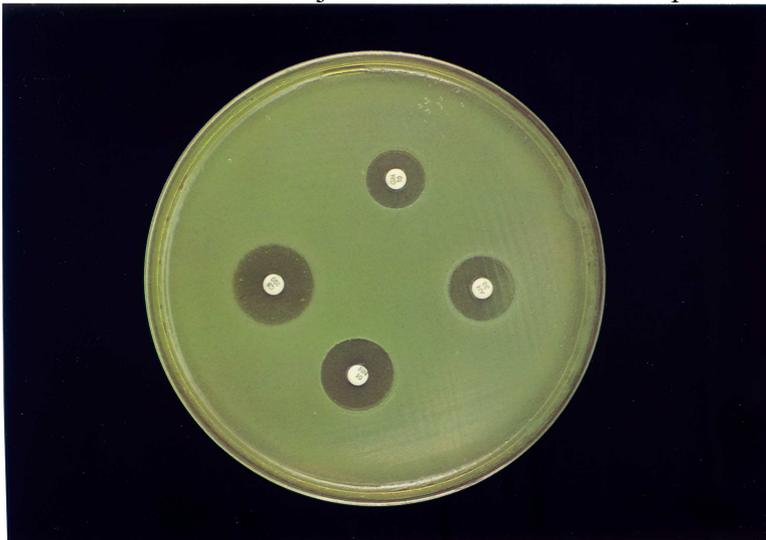
La adquisición de resistencia a un antibiótico antibacteriano en el transcurso de una infección no es sino un ejemplo de la rápida **capacidad de adaptación** de las poblaciones bacterianas **a los cambios de su entorno** a través de sus **mecanismos de variación** de su dotación genética.

El descubrimiento de antibióticos antibacterianos eficaces llevó a pensar que estábamos cerca de erradicar epidemias tan mortíferas como la tuberculosis. Por desgracia no solo no ha sido así sino que hoy tememos que vuelvan a aumentar las tasas de mortalidad si llegan a generalizarse los brotes producidos por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que han adquirido resistencia a todos los antituberculosos de uso común. **El uso racional** y restringido de los antibióticos es un factor clave para **controlar la extensión de los genes de resistencia** que los invalidarían por completo.

Técnicas para cuantificar la resistencia a los antibióticos

Como la resistencia amenudo no es homogénea entre las cepas de una misma especie patógena, las **terapias empíricas** basadas en el diagnóstico de la especie causal **pueden fallar**. La forma más adecuada de elegir la antibioterapia es aislar la cepa causante de la infección a partir de muestras clínicas del paciente, y medir su sensibilidad in vitro a diferentes antibióticos. Para ello el procedimiento habitual es hacer un **antibiograma** por difusión en agar. Una vez sembrada la cepa en la superficie del agar se colocan encima discos de papel de filtro impregnados con una concentración conocida de cada antibiótico, que se difundirá por el agar. Después de la incubación se mide el diámetro del **halo de inhibición de crecimiento** que rodea cada disco y mediante una tabla de valores estandar se establece si la cepa bacteriana es **sensible o resistente** a la concentración de antibiótico que debe emplearse en el tratamiento. (3.4.).

Una vez aislada la bacteria también puede calcularse la CMI o concentración mínima capaz de inhibir su crecimiento. Para ello se inocula en varios caldos que contienen concentraciones crecientes del antibiótico y se observa, tras la incubación, cual a sido la concentración mas baja a la cual no se aprecia crecimiento en el caldo.



3.4.figura: Antibiograma por difusión en agar mostrando la inhibición del crecimiento de la bacteria alrededor de discos con antibiótico.