

Universidad Nacional de Córdoba

Doctorado en Ciencias Químicas



Influencia de la concentración de CO₂ en la regulación del estrés oxidativo generado por Ciprofloxacina

Autor:

Qca. Viviana Cano Aristizábal

Directora:

Dra. Paulina L. Páez

Departamento de Ciencias Farmacéuticas

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Año 2018

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	12
1.1 IMPORTANCIAS DE LAS EMISIONES DE CO₂	13
1.2 CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO	18
1.2.1 Radicales libres	20
1.3 ACCIÓN DE RADICALES LIBRES SOBRE MACROMOLÉCULAS	23
1.3.1 Lípidos	24
1.3.2 Proteínas	24
1.3.3 Ácido desoxirribonucleico	25
1.4 SISTEMAS DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES	26
1.4.1 Antioxidantes enzimáticos	26
1.4.2 Antioxidantes no enzimáticos	28
1.5 SECUESTRANTES DE ERO Y ERN	29
Hipótesis	31
Objetivo general	32
Objetivos específicos	32
Materiales y métodos	33
2.1 MODELO EXPERIMENTAL	34
2.1.1 Preparación del inóculo	34
2.1.2 Equipo para incubación con CO₂	34
2.1.3 Preparación del medio de reacción	35
2.2 EFECTO DEL CO₂ SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO	37
2.3 EFECTO DEL CO₂ SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR CIP	37
2.3.1 Determinación de ERO por el método de NBT	37
2.3.2 Determinación de ERO empleando la H₂-DCFDA	38

2.3.3 Determinación de ERN por el método de GRIESS.....	39
2.3.4 Determinación de proteínas por el método de Bradford	40
2.4 EFECTO DEL CO₂ EN MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	41
2.4.1 Evaluación de la peroxidación lipídica	41
2.4.2 Determinación de los AOPP.....	41
2.4.3 Determinación del potencial de membrana	42
2.4.4 Determinación del daño al ADN	43
2.5 EFECTO DEL CO₂ SOBRE LAS AXO	44
2.5.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos.....	44
2.5.2 Sistemas antioxidantes no enzimáticos	45
2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
RESULTADOS	47
3.1 EFECTO DEL CO₂ SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO	48
3.2. DETERMINACIÓN DE ERO	50
3.2.1 Método espectrofotométrico con NBT	50
3.2.2 Método espectrofluorométrico con H ₂ -DCFDA	52
3.2.2.1 Generación de ERO en presencia de secuestrantes.....	53
3.3 DETERMINACIÓN DE ERN POR EL MÉTODO DE GRIESS	57
3.3.1 Determinación de ERN en presencia de secuestrantes.....	58
3.4 EFECTO DEL CO₂ EN EL DAÑO OXIDATIVO SOBRE MACROMOLÉCULAS	62
3.4.1 Evaluación de la peroxidación lipídica	62
3.4.2 Evaluación de la oxidación de proteínas	63
3.4.3 Determinación del potencial de membrana	65
3.4.4 Determinación del daño al ADN	66
3.5 EFECTO DEL CO₂ SOBRE LOS AXO	68
3.5.1 Sistema antioxidante enzimático	68
3.5.2 Sistema antioxidante no enzimático	71

DISCUSIÓN	75
CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES	88
REFERENCIAS	92
ANEXO	104

Resumen

El rápido aumento de las concentraciones de dióxido de carbono (CO₂) en la atmósfera es una de las problemáticas actuales más preocupantes, que no solo afecta reacciones de tipo ambientales, si no también, adaptativas para los organismos aerobios. Esto es debido a que, la hidratación/deshidratación de CO₂ es una reacción fisiológica crucial para la supervivencia de estos organismos. Este proceso está conectado con numerosas vías metabólicas, como los procesos biosintéticos, que requieren CO₂ y/o bicarbonato, como también las vías bioquímicas que incluyen la homeostasis del pH, la secreción de electrolitos, entre otros.

Debido a la gran participación del CO₂ en reacciones intracelulares, se espera que cambios en las concentraciones atmosféricas afecten de una u otra manera las concentraciones de CO₂ intracelulares, afectando las reacciones de equilibrio oxidativo, que resultan ser importantes, por ejemplo, para la acción de algunos antibióticos (ATB). En los últimos años, se ha demostrado que diferentes ATB estimulan la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cual conduce a una perturbación en la célula u organismo del balance prooxidante-antioxidante a favor del primero, y este proceso se conoce como estrés oxidativo.

En base a estos conceptos, se planteó estudiar la influencia de dos concentraciones de CO₂: 50 y 50.000 ppm, sobre la acción de un antibiótico como Ciprofloxacina (CIP) sobre *Escherichia coli*. La CIP es un ATB conocido por interferir con la replicación y transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano mediante la inhibición de la ADN-girasa, esto conduce eventualmente a la formación de complejos de fluoroquinolona-enzima-ADN y, promueve la formación de ERO conllevando a la muerte celular bacteriana. Este trabajo de tesis doctoral se llevó a cabo con el propósito de contribuir al conocimiento de las implicancias que pudiese generar el aumento en las concentraciones de CO₂ atmosférico en la salud humana.

Para alcanzar este objetivo fue necesario el uso de diferentes técnicas. En primer lugar, se realizó una curva de muerte con dos concentraciones de CIP (0,5 y 50 $\mu\text{g/mL}$) y se estudió su efecto bactericida sobre *E. coli*, tanto en condiciones atmosféricas (CA) como de CO_2 . Se demostró que ambas concentraciones de CO_2 , disminuyen la acción de CIP, aun a altas concentraciones del ATB en un tiempo total de 8 horas.

Demostrada la implicancia que tuvo el CO_2 en la acción de CIP sobre *E. coli*, se procedió a estudiar el mecanismo secundario que induce la muerte celular de CIP (estrés oxidativo). Evaluando la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN). Además, se estudió algunas vías de formación de dichas especies, empleando secuestrantes como el Tirón, 2,2'-dipiridil y Carboxi PTIO. También se estudió los marcadores de daño oxidativos y sistema de defensa antioxidante.

Estos ensayos permitieron demostrar que el estrés oxidativo generado por CIP se modifica en presencia de CO_2 , disminuyendo la formación de ERO, aumentando la participación de óxido nítrico y glutatión (GSH). Se determinaron los daños generados en macromoléculas, observando que la oxidación de lípidos y proteínas fue mayor en presencia de CO_2 , con respecto a las CA. Esto se puede deber a que el CO_2 difunde fácilmente a través de la membrana, y posteriormente genera una rápida acidificación del pH interno de la célula bacteriana, produciendo finalmente cambios directos a estas macromoléculas.

Al cuantificar la oxidación del ADN en atmósferas modificadas de CO_2 , se pudo confirmar que ninguna de las concentraciones de CIP estudiadas genero oxidación al ADN, y esto se puede deber a la acidificación del medio intracelular producto de la acción de CO_2 , el cual genera una deprotonación de CIP, bloqueando el sitio de unión CIP-ADN-girasa, conllevando a la inhibición de la acción del antibiótico, disminuyendo su efecto y permitiendo a la bacteria replicar su material genético.

Cabe destacar que la disminución de la actividad de CIP frente a *E. coli*, fue dependiente tanto de la concentración de CIP, como de CO_2 . Por lo tanto, el CO_2

podría llegar a ser un factor importante a tener en cuenta en el mecanismo de acción y resistencia de antimicrobianos.

Abstract

The rapid increase of carbon dioxide (CO₂) concentration in the atmosphere is one of the most alarming problems today, which not only affects environmental reactions but also the adaptations of aerobic organisms. The hydration/dehydration of CO₂ is a crucial physiological reaction for the survival of these organisms. This process relates to numerous metabolic pathways, such as biosynthetic processes, which require CO₂ and/or bicarbonate, as well as, biochemical pathways that include pH homeostasis, electrolyte secretion, among others.

Due to the large participation of CO₂ in intracellular reactions, it is expected that changes in atmospheric concentrations impact the intracellular CO₂ concentrations in one way or another, affecting the oxidative equilibrium reactions, which are important, for example, for some antibiotics (ATB) action. In recent years, it has been shown that different ATBs stimulate the formation of reactive oxygen species (ROS), which leads to disturbance in the cell or organism of the prooxidant-antioxidant balance in favor of the first one, and this process is known as oxidative stress.

Based on these concepts, it was proposed to study the influence of two CO₂ concentrations: 50 and 50,000 ppm, on the action of an antibiotic such as ciprofloxacin (CIP) on *Escherichia coli*. CIP is an ATB known to interfere with the replication and transcription of bacterial deoxyribonucleic acid (DNA) by inhibiting DNA gyrase, this eventually leads to the formation of fluoroquinolone-enzyme-DNA complexes and promotes ROS formation leading to bacterial cell death. This doctoral thesis work was carried out with the purpose of contributing to the knowledge of the implications that could be generated by the increase in atmospheric CO₂ concentrations in human health.

To achieve this goal, it necessarily used different techniques. First, a death curve was performed with two CIP concentrations (0.5 and 50 µg/mL) and its bactericidal effect was studied on *E. coli*, both under atmospheric (CA) and CO₂

conditions. It was demonstrated that both CO₂ concentrations decrease the action of CIP, even at ATB high concentrations in a total time of 8 hours.

Due to the implication that CO₂ had in the action of CIP on *E. coli*, it was proceeded to study the secondary mechanism that induces the cell death of CIP (oxidative stress) evaluating the formation of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNI) species. In addition, we have studied some ways of forming these species, using sequestrants such as Tiron, 2,2'-dipyridil and Carboxy PTIO and markers of oxidative damage and antioxidant defense system have also been studied.

These tests allowed to demonstrate that the oxidative stress generated by CIP is modified in the presence of CO₂, decreases the formation of ROS, increases the participation of nitric oxide and glutathione (GSH). The damage generated in macromolecules was determined, observing that the oxidation of lipids and proteins were greater in the presence of CO₂, with respect to CA. This is because CO₂ diffuses easily through the membrane, and then generates rapid acidification of the internal pH of the bacterial cell, eventually producing direct changes to these macromolecules.

When the DNA oxidation in modified CO₂ atmospheres is quantified, it was possible to confirm that none of the CIP concentrations studied generate oxidation to DNA. This may be due to the acidification of the intracellular medium produced by the action of CO₂, which generates a CIP deprotonation, blocking the CIP-DNA gyrase binding site, leading to the inhibition of the antibiotic action, decreasing its effect and allowing the bacteria to replicate their genetic material.

It should be noted that the decrease in CIP activity against *E. coli* was dependent on both CIP and CO₂ concentration. Therefore, CO₂ could become an important factor to be taken into account in the action mechanism and resistance of antimicrobials.

ABREVIATURAS

8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
ADN	ácido desoxirribonucleico
LB	Luria-Bertani
ANS	1-anilino-8-naftaleno sulfonato
AOPP	productos proteicos de oxidación avanzada
ATB	Antibiótico
ATCC	American Type Culture Collection
ATS	agar tripteína soya
AXO	sistemas de defensa antioxidantes
CA	condiciones atmosféricas
CAT	Catalasa
CH ₃ COOH	ácido acético
CIP	Ciprofloxacina
CO ₂	dióxido de carbono
CO ₃ ⁻²	ión carbonato
CO ₃ ^{*-}	radical anión carbonato
CPTIO	carboxi-PTIO
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	ácido 5,5'ditiobis-2-nitrobenzoico
ERN	especies reactivas del nitrógeno
ERO	especies reactivas del oxígeno
FRAP	poder reductor del hierro total
GSH	glutación reducido
GP _x	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GSSG	glutación oxidado
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
H ₂ CO ₃	ácido carbónico
HCO ₄ ⁻	ión peroximonocarbonato
H ₂ -DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia

H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
IK	ioduro de potasio
K ₂ MnO ₄	dicromato de potasio
MDA	Malondialdehído
NaNO ₂	nitrito de sodio
NBT	azul de nitrotetrazolio
NEDD	N-(1-naftil) etilendiamina
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₂	dióxido de nitrógeno
N ₂ O ₃	tríoóxido de dinitrógeno
O ₂	oxígeno molecular
¹ O ₂	oxígeno singlete
O ₂ ^{• -}	radical anión superóxido
HO [•]	radical hidroxilo
NO	óxido nítrico
ONOO ⁻	anión peroxinitrito
ONOOH	ácido peroxinitroso
PBS	buffer fosfato salino
ROO [•]	radical peroxilo
RL	radicales libres
SOD	superóxido dismutasa
TBA	ácido tiobarbitúrico
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
Trx	Tiorredoxina
UFC	unidades formadoras de colonias
WMO	World Meteorological Organization



Capítulo 1

Introducción

En este capítulo se abordan las problemáticas sobre las emisiones del CO₂ y como éstas, no solo generan cambios en reacciones ambientales, sino también, como pueden llegar a afectar reacciones intracelulares en organismos aerobios.

1.1 IMPORTANCIAS DE LAS EMISIONES DE CO₂

Los niveles de dióxido de carbono (CO₂) se han convertido en un importante tema de estudio para la comunidad científica a nivel mundial debido a su contribución al efecto invernadero, por ser uno de los productos mayoritarios y con tiempos de vida prolongados en los procesos de degradación atmosférica^{1,2}. El crecimiento de la población, las prácticas agrícolas intensificadas, la deforestación, la industrialización y el uso de combustibles fósiles como fuente de energía, han contribuido al aumento de las concentraciones de los gases de efecto invernadero desde los comienzos de la era industrial, en 1750³.

Desde 1990, ha habido un aumento del 40% en el calentamiento global del planeta debido a todos los gases de efecto invernadero de larga duración, y un aumento del 2,5% desde 2015 hasta 2016, según cifras del US National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA)^{4,5}.

En el año 2016, las concentraciones de CO₂ tuvieron un aumento alarmante, llegando al nivel más alto en 800.000 años según estimaciones de World Meteorological Organization (WMO). Este aumento alcanzó una concentración de 403,3 ppm, gracias a una combinación de fuentes antropogénicas y naturales (un fuerte episodio del fenómeno El Niño)⁶. El Niño es un patrón climático que implica cambios en la temperatura de las aguas en la parte central y oriental del océano Pacífico tropical. En intervalos de tiempo muy irregulares que pueden ir desde un a siete años, las aguas superficiales de una gran franja de este océano se calientan o enfrían entre 1 y 3 °C, en comparación a la temperatura normal (-1.4 y 30 °C). Este calentamiento y enfriamiento oscilante afecta directamente a la distribución de las precipitaciones en esta región y puede tener una fuerte influencia sobre el clima en las otras partes del mundo^{7,8}.

El año 2017 fue el más cálido registrado sin un evento del fenómeno El Niño⁹ y las cifras promedio mundiales de las emisiones de los gases del efecto invernadero no estarán disponibles si no, hasta finales del 2018¹⁰. Además, La WMO y el Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), argumentaron en

el informe especial sobre escenarios de emisión, que para el año 2100 las proyecciones climáticas más desfavorables predicen un aumento de las concentraciones de CO₂ de 1.000 ppm¹¹.

Según Climate Transparency, Argentina se ubica en la posición 28 en una lista de 220 países que más contribuyen a la contaminación atmosférica, con un aporte percapita equivalente a $4.15E^{-2}$ ppm de CO₂ en el año 2017, y se pronostica para el 2030 una liberación de CO₂ sería de 6×10^{-2} ppm¹². El último reporte disponible de las emisiones de CO₂ en equilibrio (cantidad de CO₂ liberado y degradado en los procesos naturales) es del año 2014, y fue realizado por Puliafito *et al.* donde reporta que Argentina, contribuía con $1.85E^{-2}$ ppm al año de CO₂, y los sectores de la energía (incluido el transporte) y la agricultura son los que más contribuyen en estas emisiones¹³.

La gravedad del daño causado por el hombre en el cambio climático no solo depende de la magnitud del cambio, sino también del potencial de irreversibilidad. Se ha demostrado que los cambios climáticos causados por el aumento de las concentraciones CO₂ son en gran medida irreversibles, y aunque hubiese un cese de las emisiones, la eliminación del CO₂ atmosférico reduciría el calentamiento global, pero se compensaría en gran medida con una menor pérdida de calor en el océano, de modo que las temperaturas atmosféricas no disminuirían significativamente durante al menos 1.000 años. Si las concentraciones atmosféricas de CO₂ aumentan desde los niveles actuales hasta 450 - 600 ppm durante el próximo siglo, deberían esperarse entre los impactos: un futuro más cálido, con más extremos climáticos, pérdidas de fuentes hídricas, aumento del nivel del mar, acidificación y el calor de los océanos, el deshielo de los glaciales, entre otros¹⁴.

Las consecuencias del aumento del CO₂, no solo tiene implicancias a nivel atmosférico y climático; si no también, a nivel biológico en organismos aerobios en el proceso de respiración, la cual está constituida por dos procesos: respiración externa, que es la absorción de oxígeno molecular (O₂) y eliminación de CO₂ del organismo como un todo; y la respiración interna, la cual se refiere a la

utilización de O_2 y producción de CO_2 en las células, así como los intercambios gaseosos entre las células y su medio líquido intracelular¹⁵.

La concentración de CO_2 interna en el cuerpo humano es de aproximadamente 50.000 ppm (5%)¹⁶. En reposo, el ser humano normal respira de 12 a 15 veces por minuto, en este proceso se inspiran y espiran cerca de 500 mL de aire en cada respiración, o de 6 a 8 L/min. En este aire inspirado se encuentran trazas de otros gases en los que se incluye el CO_2 , los cuales ingresan al sistema respiratorio, donde se mezclan con el gas presente en los alvéolos y, por difusión simple, el O_2 entra en la sangre de los capilares pulmonares, mientras el CO_2 ingresa a los alvéolos. De esta manera, 250 mL de O_2 entran en el organismo cada minuto y se excretan 200 mL de CO_2 ¹⁷.

En el ser humano, el CO_2 que difunde a los eritrocitos se hidrata con rapidez para formar ácido carbónico (H_2CO_3) por la presencia de anhidrasa carbónica. Este ácido se disocia en hidrogeniones y bicarbonato (HCO_3^-) y el hidrogenión se amortigua, sobre todo por la acción de la hemoglobina, mientras el HCO_3^- ingresa al plasma (Figura 1)¹⁸. Por otra parte, se debe tener en cuenta que el CO_2 también es el subproducto mayoritario del metabolismo celular y además el principal sistema buffer de pH fisiológico en organismos eucariotas¹⁹. Es sabido que el CO_2 metabólico debe estar en equilibrio con el CO_2 proveniente de la atmósfera, por lo tanto, al haber un aumento en las concentraciones atmosféricas de CO_2 , se podría generar un desbalance en el proceso respiratorio anteriormente nombrado (Figura 1)^{20,21}. Se debe tener en cuenta que este desequilibrio favorecería la producción del radical anión carbonato ($CO_3^{\bullet -}$), el cual se produce por oxidación de un electrón de ión carbonato (CO_3^{2-}) o HCO_3^- con el radical hidroxilo (HO^{\bullet}).

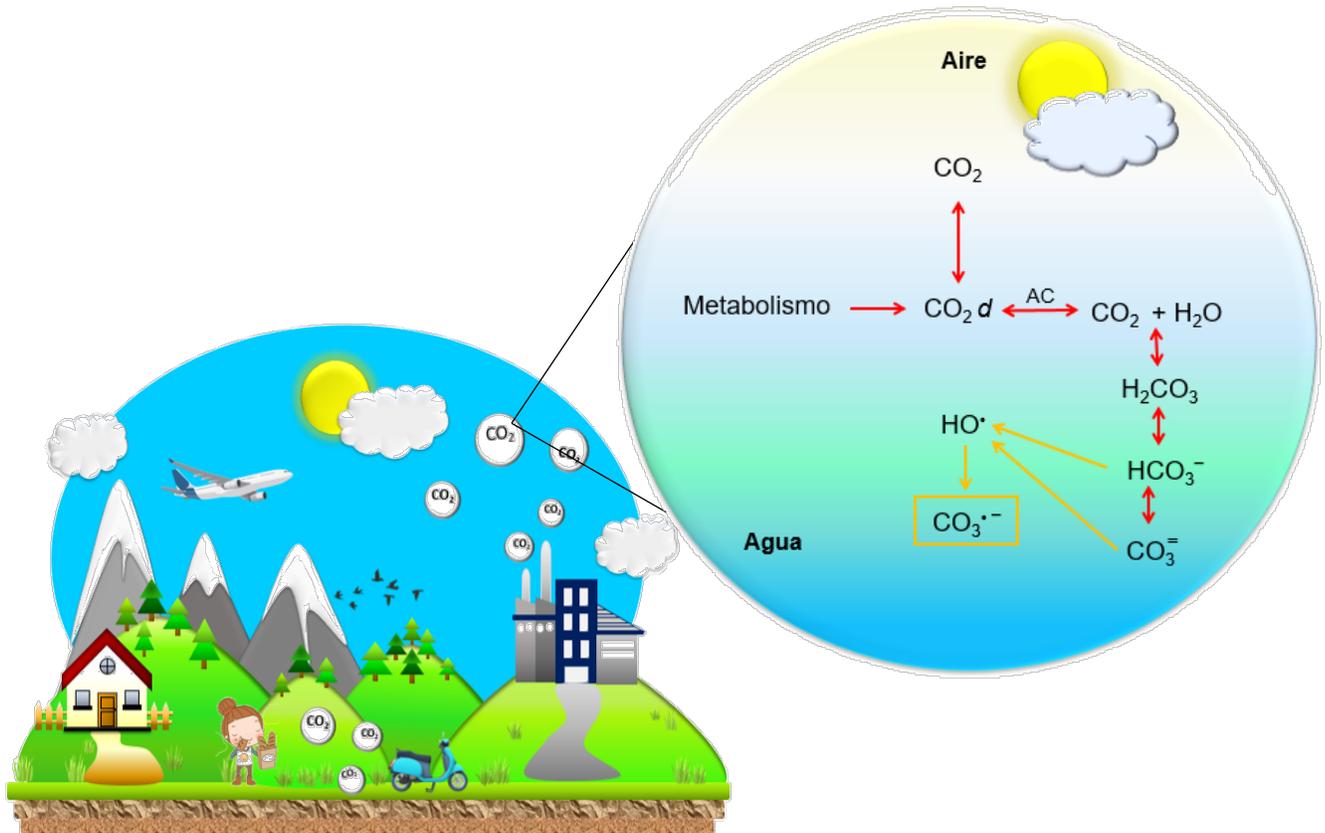
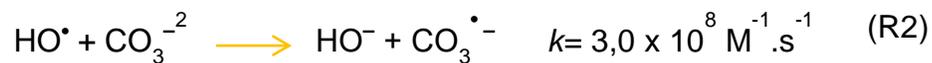
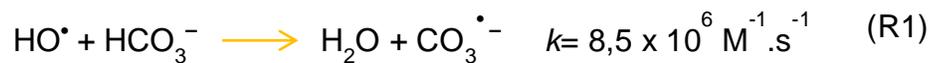


Figura 1. Reacciones de equilibrio entre el CO₂ atmosférico e intracelular

El HO• en sí mismo oxida estos aniones por reacciones cuyas constantes de velocidad (R1 y R2)²² son bajas en comparación con la mayoría de las reacciones de biomoléculas ($k \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y de oxidación de NO₂⁻ (R3)²³



De hecho, aunque tiene un potencial oxidante menor que el HO[•], estudios *in vitro* han demostrado que el CO₃^{•-} oxida de forma rápida y más específica residuos de guanina en el ADN, así como residuos de aminoácidos como triptófano, cisteína, tirosina, metionina e histidina^{24,25}. Finalmente, Liochev y Fridovich en 2004 demostraron *in vitro* que el CO₂ se convierte en CO₃^{•-} por la actividad peroxidasa de Cu, Zn- superóxido dismutasa (SOD)²⁶. Las constantes de velocidad de segundo orden de las reacciones de CO₃^{•-} con moléculas biológicas son bien conocidas y tienen relevancia biológica (10⁶–10⁹ M⁻¹ .s⁻¹)²⁷.

Por otra parte, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) podría reaccionar directamente con el CO₂ disuelto para generar ión peroximonocarbonato (HCO₄⁻, R4), otro oxidante fuerte (EHCO₄⁻/HCO₃⁻ = 1,8 V)²⁸. *In vitro*, se ha demostrado que HCO₄⁻ puede oxidar metionina y sulfuros o una amina terciaria más rápidamente (100 - 400 veces) que H₂O₂^{28,29}.



Si bien los niveles de CO₂ atmosférico están aumentando rápidamente, estos siguen siendo aún bajos, comparo con los niveles de CO₂ en organismos aerobios (50.000 ppm, 5%), pero estudios han demuestran que un gran aumento en la concentración de CO₂ atmosférico (1-10%) afecta reacciones bioquímicas a nivel celular que conducen a un incremento en el estrés oxidativo intracelular en neutrófilos humanos³⁰, inflamación pulmonar en el ratón³¹ y aumento de la virulencia de diferentes patógenos bacterianos^{32,33}. Comprobando que, al aumentar las concentraciones atmosféricas, el equilibrio anteriormente nombrado se modifica, generando cambios que podrían llegar a ser desfavorables para la salud humana.

Por lo tanto, surge como pregunta ¿Qué sucedería con patologías donde el desequilibrio hidroelectrolítico, perturbación del pH o eliminación del CO₂ fuese crucial? Como por ejemplo la hipercapnia; esta enfermedad surge por la falta de ventilación pulmonar, en la que la insuficiencia respiratoria, y el esfuerzo por controlarla, hace que se inhale mucho CO₂ el cual no se logra evacuar,

generando una retención de CO₂, provocando una acidificación respiratoria, la cual termina deteriorando la salud de quien la padece^{34,35}. Estudios recientes han identificado la hipercapnia como un factor de riesgo independiente de mortalidad en pacientes hospitalizados con neumonía³⁶ y pacientes con fibrosis quística en espera de trasplante de pulmón³⁷. A pesar de conocer esta información, generalmente se ha visto la hipercapnia únicamente como un marcador de enfermedad avanzada, sin considerar la posibilidad de una relación causal entre el aumento de CO₂ atmosféricos y los resultados clínicos adversos, en infecciones respiratorias o fibrosis quística.

Las infecciones respiratorias son la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística³⁸. *Pseudomonas aeruginosa* sigue siendo el principal agente patógeno involucrado en estos procesos infecciosos³⁹. Estudios recientes demostraron que tanto bacterias gramnegativas y grampositivas, tienen en su genoma bacteriano la capacidad de codificar anhidrasa carbónica pertenecientes a las clases α , β , y γ capaces de asegurar la supervivencia y/o satisfacer las necesidades metabólicas de las bacterias, en presencia de altas concentraciones de CO₂, esto fue demostrado mediante experimentos *in vivo* e *in vitro*^{40,41}. Por lo tanto, una mejor comprensión de la adaptación bacteriana y la supervivencia en ambientes con alta concentración de CO₂ es de gran importancia para el desarrollo de futuras terapias antimicrobianas.

1.2 CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO

Las células vivas de organismos aerobios utilizan O₂ para la respiración u oxidación de nutrientes para obtener energía, en este proceso se generan más del 90% de los subproductos reactivos del oxígeno, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO)⁴².

Estas ERO son, en su mayoría, radicales libres (RL), que tienen al menos un electrón desapareado en su órbita más externa, confiriéndoles una gran reactividad química oxidante, capaz de reaccionar con macromoléculas biológicas

como ADN, lípidos y proteínas con el fin de estabilizarse, generando daños en la célula. El anión radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 y HO^{\cdot} , son las ERO mayoritarias en los sistemas biológicos^{43,44}. Asimismo, existen también RL nitrogenados o especies reactivas del nitrógeno (ERN), como el óxido nítrico (NO), $ONOO^-$ y trióxido de dinitrógeno (N_2O_3)⁴⁵.

Para proteger a las células del daño oxidativo de estos radicales, los organismos han desarrollado varios mecanismos de defensa para eliminarlos de forma rápida y eficientemente del entorno intracelular. Cuando el equilibrio entre las ERO y los sistemas de defensa antioxidantes (AXO) está desequilibrado en favor de los oxidantes, se genera la condición que se conoce como estrés oxidativo (Figura 2)⁴⁴.

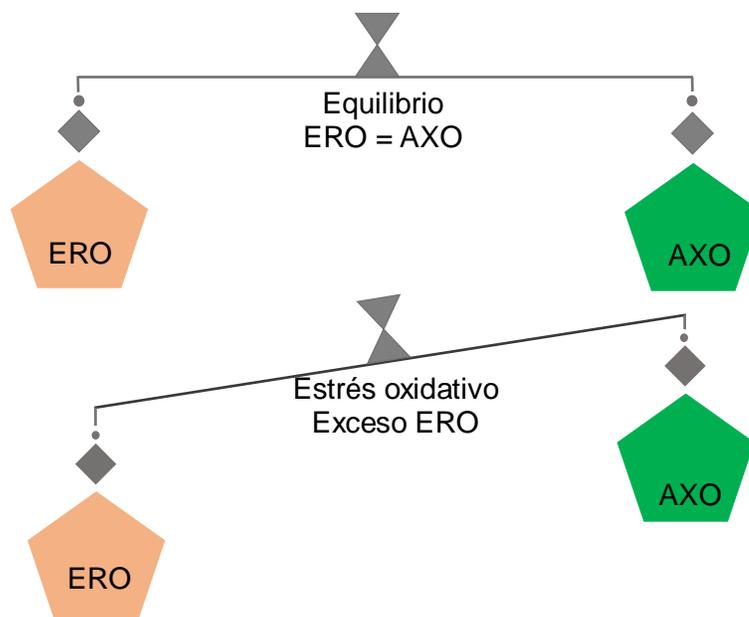


Figura 2. **Equilibrio entre ERO y AXO**

El estrés oxidativo también puede ser estimulado por causas exógenas como la exposición a radiaciones, luz, metales, fármacos, etc⁴⁶. Asimismo, en los últimos años se han descrito algunos antibióticos (ATB) como estimulantes de estrés oxidativo, ya que al incrementar la concentración de estos, se produce un

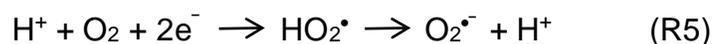
consumo mayor de O₂, lo cual conlleva a un incremento en la producción de ERO.⁴⁷

Ciprofloxacina (CIP) es un ATB de la familia de las fluoroquinolonas, de amplio espectro muy empleado para el tratamiento de infecciones urinarias, diarreas bacterianas e infecciones de la próstata. Es conocida por interferir con la replicación y transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano mediante la inhibición de la ADN-girasa/topoisomerasa II y la topoisomerasa IV del ADN⁴⁸. Esto conduce eventualmente a la formación de complejos de quinolona-enzima-ADN y, por lo tanto, la generación de ERO como el oxígeno singlete (¹O₂) y O₂^{•-}, y la posterior muerte celular. Además, varios efectos secundarios de la CIP, incluida la fototoxicidad y las tendinopatías, se correlacionaron con la generación de ERO en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*^{47,49-52}. A esto se suma el hecho de que la estimulación de ERO es inmediata, acompañando al mecanismo primario de acción del ATB. Por lo tanto, la sobre estimulación de ERO puede estar acompañando al mecanismo primario de acción de CIP^{53,54}.

1.2.1 RADICALES LIBRES

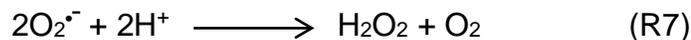
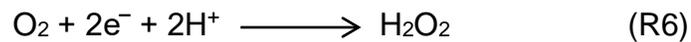
1.2.1.1 Radical anión superóxido

El O₂^{•-} se forma a partir del O₂ mediante la adición de un electrón. A pesar de ser un RL, no es altamente reactivo, carece de la capacidad de penetrar las membranas lipídicas y, por lo tanto, está limitado al compartimento donde se produjo. La formación de O₂^{•-} ocurre espontáneamente en ambientes aerobios y en reacciones no enzimáticas del O₂ con la cisteína o la riboflavina, o bien se produce en la cadena respiratoria (R5). Su potencial toxicidad radica en la capacidad para formar H₂O₂ y O₂ siendo esta reacción catalizada por la enzima SOD⁵⁵.



1.2.1.2 Peróxido de hidrógeno

El H₂O₂ no es un RL, pero es considerado como tal, debido a su capacidad para penetrar membranas biológicas. Además, es intermediario en la producción de ERO más reactivas, como HO• a través de la oxidación de metales de transición. En los medios biológicos es formado tras la reducción directa del O₂ por dos electrones (R6) y por dismutación del O₂^{•-} (R7).



Una vez producido, el H₂O₂ es eliminado por al menos tres sistemas de enzimas antioxidantes; catalasas (CAT), glutatión peroxidasas (GP_x) y peroxirredoxinas⁵⁶.

1.2.1.3 Radical hidroxilo

El HO• es la ERO más oxidante para los sistemas biológicos. Se forma a partir de H₂O₂ en una reacción catalizada por iones metálicos (Fe⁺² o Cu⁺), que suelen estar unidos a complejos con diferentes proteínas u otras moléculas, esta reacción es conocida como la reacción de Fenton⁵⁷ (R8).



El O₂^{•-} también juega un papel importante en la producción de HO•, por medio de la reacción de Haber-Weiss⁵⁸ reciclando los iones metálicos (R9).



Por lo tanto, los metales de transición desempeñan un papel importante en la formación de HO^\bullet al ser liberados a partir de proteínas como la ferredoxinas y el centro [4Fe-4S] mediante las reacciones con $\text{O}_2^{\bullet-}$ ⁵⁹.

1.2.1.4 Oxígeno singlete

El $^1\text{O}_2$ es la forma excitada del O_2 , puede formarse a través de oxidación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) en microsomas, en la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa y lipooxigenasa, entre otras⁶⁰.

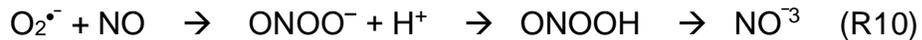
En un interesante estudio *in vivo*, se ha encontrado que un fotosensibilizador en bacterias puede generar $^1\text{O}_2$ al exponerse a la luz, lo que conduce a la oxidación de proteínas o lípidos y finalmente a la muerte bacteriana⁶¹.

1.2.1.5 Óxido nítrico

El NO es una molécula lipofílica gaseosa, lo cual le confiere la capacidad de difundir a través de las membranas celulares y a través del citoplasma, es soluble en agua, pero no reacciona con ella. Se forma enzimáticamente a partir de la arginina mediante una reacción catalizada por el óxido nítrico sintasa (NOS) y puede iniciar cambios redox o conformacionales convirtiéndolo en un oxidante fuerte, capaz de reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del ADN, entre otros fenómenos. Además, su tiempo de vida media es de unos pocos segundos, ya que reacciona rápidamente con diversas moléculas, especialmente centros de hierro, tioles y $\text{O}_2^{\bullet-}$, generando productos que pueden almacenar NO o ejercer efectos tóxicos⁶².

1.2.1.6 Anión peroxinitrito

El ONOO^- se forma a través de la reacción rápida entre el NO y el $\text{O}_2^{\bullet-}$ (R10).



En soluciones neutras es un potente agente oxidante, capaz de oxidar grupos tioles, de nitrar residuos de tirosina, oxidar guanosina, degradar carbohidratos, iniciar peroxidación lipídica y de fragmentar ADN. La descomposición de ONOO^- es compleja. El anión es bastante estable en soluciones alcalinas, pero se descompone rápidamente ($t_{1/2} = 1$ s a pH 7,4, 37 °C) tras la protonación a ácido peroxinitroso (ONOOH) (pKa 6,8)⁶³. Algunos estudios han argumentado que el ONOOH se disocia para generar HO^\bullet y dióxido de nitrógeno (NO_2). Esta hipótesis se basa en la sensibilidad a los captadores de HO^\bullet de ciertas reacciones inducidas por ONOO^- , incluida la formación de malondialdehído (MDA) a partir de desoxirribosa y la hidroxilación en el anillo bencénico de benzoato de sodio, fenilalanina y tirosina^{64,65}. También se ha comprobado que ONOO^- en presencia de HCO_3^- o CO_2 , para formar el anión peroxinitrosocarbonato (ONOOCO_2^-) y los radicales derivados de la homólisis de esta especie (NO_2 y $\text{CO}_3^{\bullet-}$) también juegan un papel en la inducción de daño oxidativo⁶⁶.

1.3 ACCIÓN DE RADICALES LIBRES SOBRE MACROMOLÉCULAS

Como se mencionó anteriormente, las ERO son altamente reactivas y tienen una vida media de segundos, por lo que, su determinación *in vivo* e *in vitro* se dificulta. Una forma indirecta de estudiar estas especies es monitoreando los cambios producidos en sus objetivos finales (lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN). Después del ataque de las ERO, se generan modificaciones que tienen una vida media de horas a semanas, lo que los convierte en marcadores ideales de estrés oxidativo⁶⁷.

1.3.1 Lípidos

Los ácidos grasos poliinsaturados son muy sensibles a los ataques de ERO, ya que poseen una serie de dobles enlaces, que los convierte en objetivos excelentes para el HO[•], hidroperoxilo (HO₂) y en algunas ocasiones el ¹O₂⁶⁸.

La forma en la que actúan los radicales es a través de la extracción un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metileno del ácido graso poliinsaturado, formando un radical lipídico. Éste reacciona con el O₂ y seguido de una serie de reacciones consecutivas se genera un nuevo radical lipídico y un hidroperoxido lipídico. El radical lipídico entonces se combina con otra molécula de O₂ y continúa la reacción en cadena, ocasionando la peroxidación lipídica.

Esto proceso es particularmente relevante cuando afecta los lípidos que constituyen la membrana biológica, ya que se alteran las propiedades como la fluidez y el potencial de permeabilidad iónica, conduciendo finalmente a la pérdida de la integridad de ésta provocando roturas que liberan el contenido de la célula⁶⁹.

Los hidroperoxidos formados se descomponen en etano, pentano, aldehídos reactivos y cetonas. Entre los aldehídos formados se encuentra el MDA⁷⁰ y el 4-hidroxinonenal, estos pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, produciendo efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos^{71,72}.

1.3.2 Proteínas

Las interacciones de las ERO con las proteínas pueden causar daños sobre los enlaces insaturados, los anillos aromáticos y los grupos tiol (-SH) de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina, ocasionando la fragmentación de la cadena peptídica, oxidación de aminoácidos específicos, pérdida de actividad de la proteína por desnaturalización y conduciendo a una mayor susceptibilidad a la proteólisis⁷³.

Los efectos de los RL sobre las proteínas dependerán no solo de la localización de los aminoácidos que median la conformación y actividad de la

proteína sino, también de los grupos tiol presentes en la estructura proteica, debido a que estos son responsables de la estabilidad, despliegue y degradación⁷⁴. Además, las enzimas que tienen metales en o cerca de sus sitios activos son especialmente más sensibles a la oxidación catalizada por metales⁷⁵.

Una forma de identificar los daños ocasionados por estas ERO sobre las proteínas es a través de los productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP), ya que estos se consideran como una medida del daño oxidativo en proteínas altamente oxidadas⁷⁶.

1.3.3 Ácido desoxirribonucleico

Los RL pueden reaccionar con todos los componentes del ADN, produciendo muchos tipos de alteraciones, siendo mayoritario el daño en las bases del ADN como las purinas y pirimidinas.

El mecanismo consiste en la abstracción de hidrógeno de la 2-desoxirribosa que conduce a la formación de radicales de carbono que, en presencia de O₂, pueden convertirse en radicales peroxilo (ROO[•]). Los ROO[•] a través de diferentes reacciones, también pueden abstraer átomos de hidrógeno de los restos de azúcar, lo que conduce a rupturas de cadena de ADN. Sin embargo, la vía más frecuente de rupturas de ADN sucede cuando la extracción del hidrógeno es mediada por HO[•], originando problemas en la compactación y enrollamiento del ADN^{77,78}.

Se han desarrollado una serie de ensayos selectivos y sensibles que van desde métodos enzimáticos, hasta los procedimientos cromatográficos que permiten medir los daños generados al ADN. Uno de estos métodos consiste en la determinación de la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). La 8-OHdG, es el efecto mutagénico más presentado en la oxidación de ADN generado por ERO, debido a que esta se empareja incorrectamente con adenina en vez de hacerlo con citosina, convirtiéndola en un buen marcador de daño oxidativo⁷⁹.

1.4 SISTEMAS DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es cualquier sustancia que está presente en bajas concentraciones en comparación con las de un sustrato oxidable y retrasa o evita significativamente la oxidación de ese sustrato⁸⁰.

Las células de organismos aerobios constantemente están censando los niveles de ERO y activan sus mecanismos de defensa para neutralizar y prevenir los procesos degenerativos asociados a éstas.

Los AXO son la primera línea de defensa contra las ERO metabolizándolas a subproductos inocuos y se clasifican en sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Entre los sistemas enzimáticos encontramos la SOD, CAT y enzimas dependientes de glutatión como GPx y glutatión reductasa (GR) los cuales son responsables de la eliminación de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 evitando la formación de HO^{\bullet} . Los sistemas no enzimáticos son antioxidantes de menor peso molecular como carotenoides, vitaminas E, K y C, aminoácidos, antioxidantes tiol como glutatión reducido (GSH) y tioredoxinas (Trx), entre otros, y pueden reaccionar con ERO o servir de sustratos de enzimas defensivas⁸¹.

1.4.1 Antioxidantes enzimáticos

1.4.1.1 Superóxido dismutasa

Esta enzima es la responsable de la primera reacción enzimática en la ruta de reducción del O_2 . La SOD inhibe la producción de $O_2^{\bullet-}$ dismutando dos moléculas de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y O_2 (R11).



Posee metales de transición (Fe, Mn, Ni o CuZn) en sus sitios activos, permitiéndole el intercambio rápido de electrones entre los dos $O_2^{\bullet-}$.

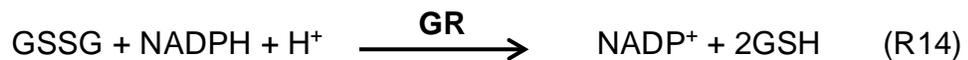
Actualmente se conocen cuatro isoformas de SOD: Fe-SOD, Mn-SOD, Ni-SOD y Cu/Zn-SOD; suelen estar localizadas en el espacio periplásmico o en la matriz de células procariotas⁸².

1.4.1.2 Glutación Peroxidasa y Reductasa

La peroxidasa más abundante es GPx, que está presente tanto en el citosol como en la mitocondria de células eucariotas. Esta enzima tiene selenio como metal de transición en su sitio activo y utiliza GSH como sustrato para transferir electrones al H₂O₂ convirtiéndolo así en dos moléculas de H₂O y glutatión oxidado (GSSG).

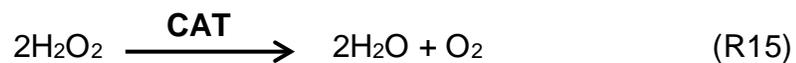


La GPx necesita GSH para poder realizar su función, oxidándolo a GSSG. Las células disponen de una vía capaz de regenerar este GSH. Esta vía es catalizada por la enzima GR, que es una enzima que se encuentra en el citoplasma y tiene una coenzima FAD en su sitio activo, la cual consume NADPH para regenerar el GSH⁸³ (R14).



1.4.1.3 Catalasa

Es la segunda enzima metabolizadora de H₂O₂; presenta en su sitio activo una molécula de ión férrico y convierte dos moléculas de H₂O₂ en dos moléculas de H₂O y O₂ (R15) ⁸⁴.



La CAT es una de las enzimas más eficaces conocidas, ya que no puede ser saturada con H₂O₂ a ninguna concentración. Aunque ésta solo es activa a concentraciones altas de H₂O₂⁸⁵.

1.4.1.4 Tiorredoxina

Las Trx son proteínas que actúan como reductoras de tiol-disulfuro, son responsables de mantener un entorno reductor celular y, por lo tanto, pueden regular la actividad de las enzimas. Están presentes tanto en organismos eucariotas como procariontes⁸⁶.



1.4.2 Antioxidantes no enzimáticos

1.4.2.1 Glutatión Reducido

El GSH se considera el antioxidante más potente producido por las células vivas, debido a que es la fuente más abundante de tioles no proteicos, este grupo es el responsable de su actividad biológica, mientras que el enlace gamma entre el ácido glutámico y la cisteína evita su degradación por las proteasas. La concentración fisiológica de GSH varía de 0,1 a 10 mM aproximadamente en bacterias⁸⁷.

Debido a sus dos grupos carboxilos, amina y grupo tiol, el GSH es altamente soluble en soluciones acuosas y en solventes polares. Presenta diversas funciones importantes, una de ellas es su función antioxidante, ya que tiene la capacidad de reaccionar con $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^{\bullet} oxidándose y formando disulfuros mezclados de glutatión-proteína, por lo tanto, la capacidad de la célula para reducir o sintetizar GSH eficientemente es clave para controlar el estrés oxidativo⁸⁸.

1.4.2.2 Vitaminas

Las vitaminas son sustancias inorgánicas que ayudan a neutralizar las ERO en el organismo, el conjunto de vitaminas que contribuye al metabolismo celular es complejo, pero se destacan por su participación en el equilibrio redox la vitamina A, vitamina C, vitamina E y el complejo vitamina B. Un ejemplo destacado es la acción antioxidante de la vitamina E, debido a su capacidad para neutralizar $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} y lipoperoxilo a formas menos reactivas, además de ser capaz de romper la reacción en cadena de lipoperoxidación que ocurre en el daño oxidativo a las membranas⁸⁹.

1.5 SECUESTRANTES DE ERO Y ERN

El término secuestrante se aplica a ciertos productos químicos o enzimáticos capaces de detener de forma física o química la producción de ERO o ERN, disminuyendo su actividad, e impidiendo que estos intervengan en los procesos celulares, facilitando estudiar el aporte de una especie u otra en los mecanismos de formación y acción degenerativos asociados a dichas especies.

Algunos de los secuestrantes más usados son: el Tirón que es un secuestrante específico para $O_2^{\bullet-}$, La 2,2'-dipiridil, que es una bipyridina simétrica que actúa como quelante de Fe^{+2} , el cual es indispensable en la reacción de Fenton, por lo tanto, es una forma indirecta de inhibir la formación de HO^{\bullet} y el carboxi-PTIO (CPTIO) es un secuestrante específico de NO ⁹⁰⁻⁹³.

La Figura 3, representa el proceso de formación de ERO y sus transformaciones a través de las defensas antioxidantes tanto enzimáticas como no enzimáticas.

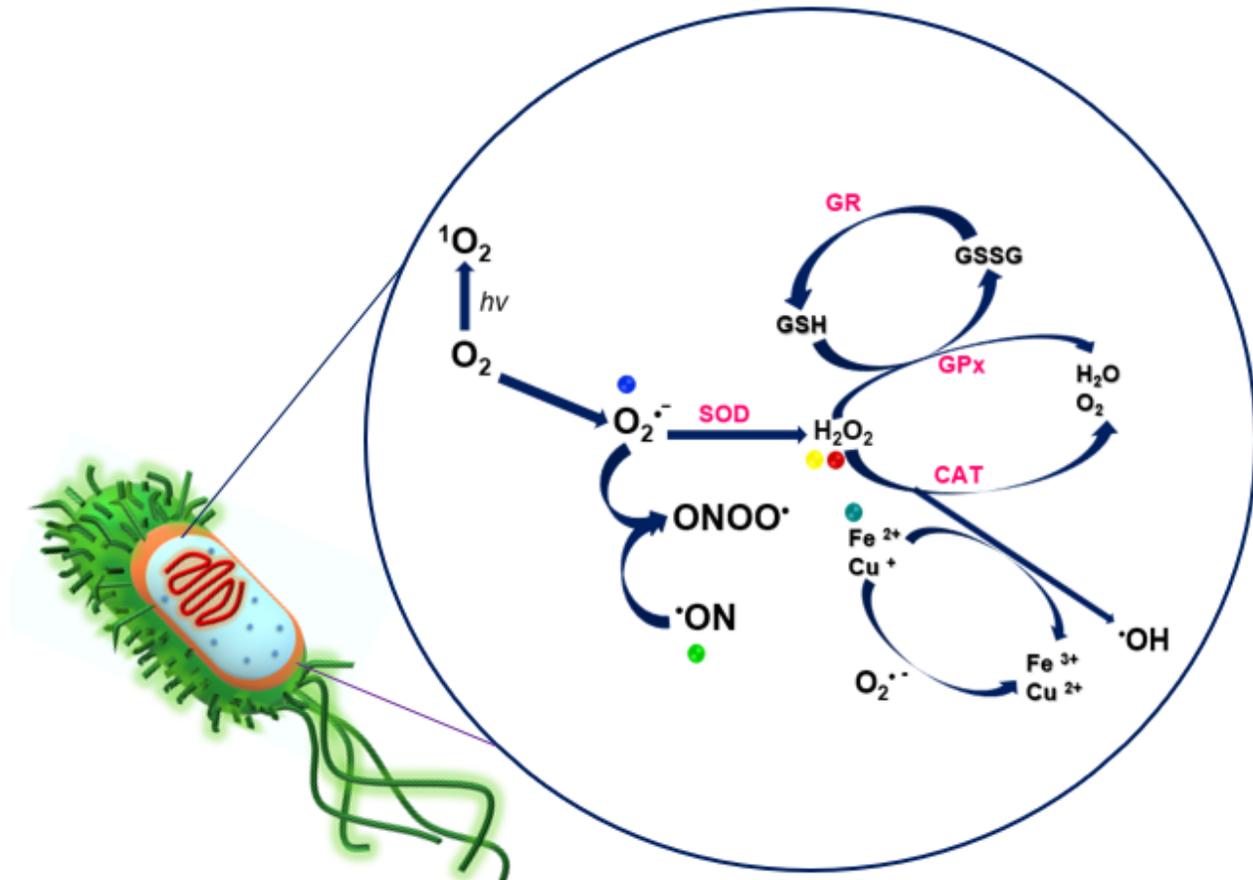


Figura 3. Generación de ERO y ERN, agentes antioxidantes y sitios de acción de secuestrantes. ● Tirón, ● 2,2'-dipiridil, ● CPTIO, ● CAT, ● GSH.

Debido a lo anteriormente expuesto en este trabajo de tesis doctoral, el interés radica en estudiar el efecto del CO_2 como agente externo, el cual podría modificar el estrés oxidativo generado por CIP en *E. coli*, con el fin de contribuir al entendimiento de las implicancias que puede llegar a tener en el mecanismo de acción del ATB y en la salud humana.

Hipótesis

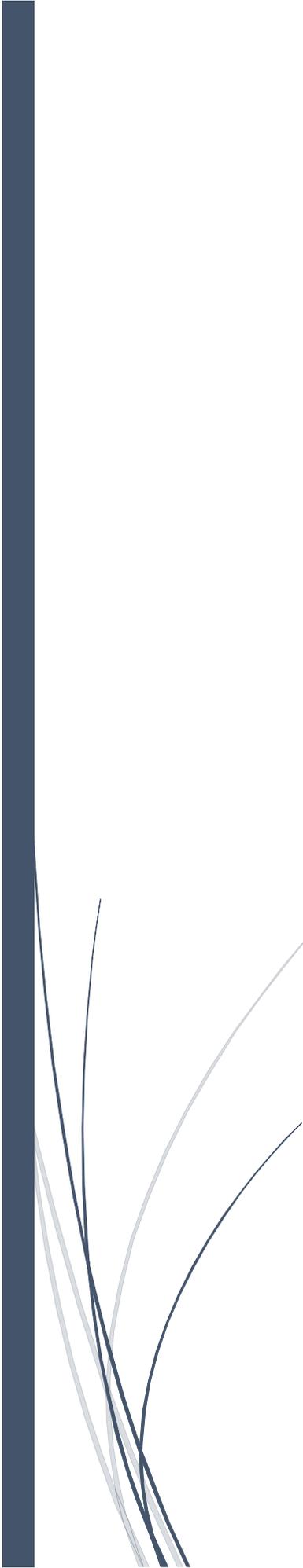
El aumento progresivo de las concentraciones atmosféricas de CO₂ puede reducir la actividad antimicrobiana de CIP en *E. coli*, ya que modifica los niveles intracelulares de ERO, disminuyendo el daño oxidativo generado por CIP en la célula bacteriana.

Objetivo general

Contribuir al entendimiento del mecanismo acción de Ciprofloxacina como generador de daño oxidativo en *E. coli* mediante la evaluación del estrés oxidativo en atmósferas controladas de CO₂, para evaluar su potencial implicancia en la salud humana.

Objetivos específicos

1. Estudiar la respuesta bacteriana de *E. coli* al estrés oxidativo generado por CIP en atmósferas controladas de CO₂.
2. Investigar la capacidad de CIP de generar ERO y ERN en *E. coli* utilizando inhibidores o secuestrantes.
3. Evaluar modificaciones del metabolismo oxidativo bacteriano mediante la determinación de marcadores de estrés, tales como oxidación de ADN, lípidos y proteínas.
4. Comparar los cambios generados en los sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, en diferentes condiciones de estrés oxidativo.

A thick, dark blue vertical bar is positioned on the left side of the page. From the bottom of this bar, several thin, light blue lines curve upwards and outwards, creating an abstract, organic shape that resembles a stylized plant or a cluster of fibers.

Capítulo 2

Materiales y métodos

En este capítulo se informa todas las técnicas y metodologías que fueron empleadas en esta tesis doctoral, para alcanzar los objetivos específicos planteados.

2.1 Modelo experimental

Todos los ensayos presentados en este trabajo de tesis doctoral fueron realizados en la ciudad de Córdoba Argentina, la cual se encuentra a una altitud de 400 m a nivel del mar, y posee una presión atmosférica de 0,95⁹⁴.

Se determinó el efecto bactericida de CIP en condiciones atmosféricas (CA), las cuales se refieren a la concentración de CO₂ mundiales 403,3 ppm para el año 2016⁶, ya que no se encontraron datos actuales a nivel país; como también en atmósferas controladas de CO₂ sobre una cepa de referencia de *E. coli* ATCC 25922, con el fin de observar modificaciones en el efecto del ATB^{50,52}.

2.1.1 Preparación del inóculo

Se utilizó la *E. coli* proveniente de un cultivo de 18 h en agar tripteína soya (ATS, Britania). Posteriormente, se realizó un *overnight* en caldo Luria Bertani (LB, MP Biomedicals), el cual fue llevado a una estufa de cultivo a 37 °C. Esta metodología fue empleada de forma general en los experimentos. Las variaciones metodológicas serán aclaradas en la sección correspondiente.

2.1.2 Equipo para incubación con CO₂

Para llevar a cabo los experimentos fue necesario adecuar un agitador orbital o recíproco para cultivo (Shaker, FERCA). Se realizaron orificios en la parte superior del equipo para permitir la instalación de mangueras de teflón por las cuales se suministró el CO₂. Las mangueras se conectaron a pipetas plásticas estériles de 1 mL a través de las cuales se suministraba el CO₂ al medio de cultivo (Figura 4).



Figura 4. Equipo para incubación con CO₂

2.1.3 Preparación del medio de reacción

2.1.3.1 Dióxido de carbono

El dióxido de carbono fue adquirido comercialmente en la empresa de gases Indura grupo AIR PRODUCTS de Buenos Aires, en proporciones 50 ppm CO₂, 20% O₂, balance (BLCE) N₂ 8 m³; y 50.000 ppm CO₂, 20% O₂, BLCE N₂ 8 m³.

2.1.3.2 Montaje experimental

Las concentraciones de CIP empleadas en este estudio fueron 0,5 y 50 µg/mL.

Se incubaron 250 µL del inóculo inicial descrito en el punto 2.1.1 con 1 mL de CIP a las concentraciones anteriormente nombradas o buffer fosfato salino (PBS, 0,05 M; pH 7,2) estéril para el control en un volumen final de 25 mL de LB. Las muestras se llevaron al shaker para incubar con CO₂ a las distintas concentraciones de estudio (Figuras 5 y 6).

Todas las reacciones fueron realizadas a una temperatura de 37 °C con agitación 140 rpm, por el tiempo que el ensayo lo requiriera.

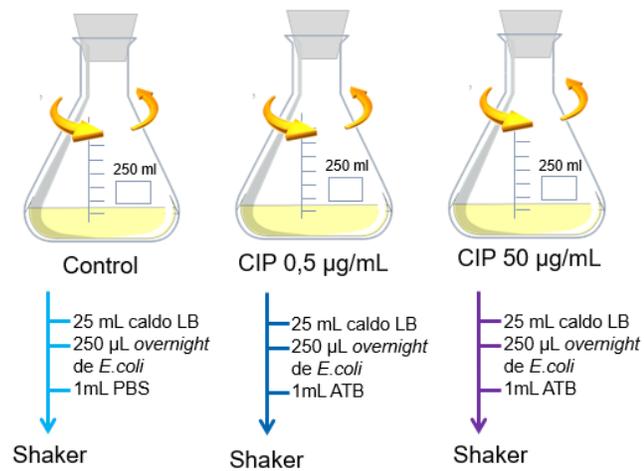


Figura 5. Esquema de incubación en CA

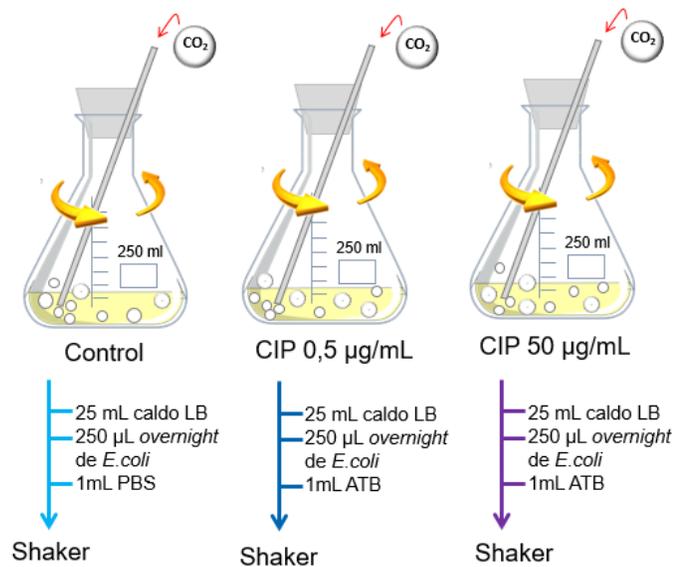


Figura 6. Esquema de incubación en atmósferas controladas de CO₂

2.2 Efecto del CO₂ sobre el crecimiento bacteriano

El montaje experimental se realizó según lo mencionado en el punto 2.1.3.2 tomando muestras a cada hora de reacción desde el tiempo cero, hasta 8 h. A continuación, se realizaron diluciones seriadas de dichas muestras en caldo LB. Se tomaron 100 µL de cada dilución y se sembró en placas con agar LB para realizar una siembra en superficie, posteriormente fueron llevadas a la estufa de cultivo a 37 °C. El crecimiento bacteriano fue observado pasadas 18 h de incubación. Las curvas fueron construidas graficando las UFC/mL que sobrevivieron respecto al tiempo, en presencia y ausencia del ATB^{95,96}.

2.3 Efecto del CO₂ sobre el estrés oxidativo inducido por CIP

2.3.1 Determinación de ERO por el método de NBT

Esta metodología se fundamenta en el hecho de que el azul de nitrotetrazolio (NBT), de color amarillo en su estado natural, es reducido a formazán en presencia de ERO, tornándose de color azul-negro el cual puede ser medido espectrofotométricamente a 575 nm⁹⁷.

Se tomaron 200 µL de cada muestra del punto 2.1.3.2 a cada hora de reacción, partiendo del tiempo 0, hasta un tiempo final de 3 h. Posteriormente, se le agregó 50 µL de NBT 1 mg/mL (Sigma) y se incubó durante 30 min a 37 °C en oscuridad. Pasado este tiempo se adicionó 10 µL de HCl 0,1 N (Cicarelli) con el fin de detener la reacción. Por último, se agregó 40 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Cicarelli) para poder obtener el NBT reducido a nivel intracelular. El producto obtenido se midió en un lector de absorbancia (Abs) de microplacas (Sunrise, Tecan Trading AG). Además, se realizó un control negativo de Abs en paralelo (suspensión de *E. coli*, sin ATB, ni reactivo de NBT), el cual fue restado a los datos obtenidos. Los valores de la Abs_{540nm} corresponde a las ERO se relativizo a valores de UFC/mL (ERO/UFC.mL⁻¹)^{54,98,99}.

2.3.2 Determinación de ERO empleando la H₂-DCFDA

La sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂-DCFDA) es una sonda lipofílica no fluorescente que difunde y atraviesa la membrana celular, seguidamente es desacetilada bajo la acción de las esterasas intracelulares para formar H₂DCF, que también es no fluorescente, pero que al reaccionar con ERO es oxidada a un compuesto fluorescente (diclorofluoresceína, DCF), que puede ser medido en un espectrofluorómetro (excitación 480 nm, emisión 520 nm)^{100,101}.

Las muestras fueron tratadas como se describió en el paso 2.1.3.2. Se tomaron 200 µL de cada una de las muestras en estudio, a los tiempos de 0, 1, 2 y 3 h de reacción. Posteriormente, se adicionó 20 µL de la sonda H₂-DCFDA (Sigma) a una concentración de 10 µM. Seguidamente se incubó a 37 °C durante 30 min en oscuridad. Pasado este tiempo se determinó la fluorescencia en un espectrofluorómetro Biotek Synergy HT. Se realizó un control negativo de fluorescencia (suspensión de *E. coli*, sin ATB, ni H₂-DCFDA), el cual fue restado a los datos obtenidos. Los resultados se expresaron como fluorescencia en unidades arbitrarias (u.a) de las ERO presentes en las muestras en función de las UFC/mL^{102,103}.

2.3.2.1 Determinación de ERO en presencia de secuestrantes

Para el diseño experimental se siguieron los pasos nombrados en el punto 2.1.3.2 pero antes de la incubación se adicionó a cada una de las muestras 1 mL del secuestrante a ser evaluado; y la cuantificación de ERO se realizó según lo descrito en el punto 2.3.2. Los secuestrantes utilizados fueron: Tirón 10 mM, (Sigma) y 2,2-dipiridil 250 µM (Sigma). Los valores fueron expresados como % de formación ERO con respecto del control de cada condición.

2.3.3 Determinación de ERN por el método de GRIESS.

Este método permite la determinación indirecta del NO a través de la medición espectrofotométrica de sus productos de descomposición más estables (nitrato, NO_3^- y nitrito, NO_2^-). La reacción de Griess es una reacción de diazotación que se da en dos pasos: el agente de nitrosación generado a partir de la autooxidación del NO o de la acidificación del NO_2^- (trióxido de dinitrógeno, N_2O_3) reacciona con sulfanilamida para producir un derivado de diazonio. Este reactivo intermediario interactúa con la N-(1-naftil) etilendiamina para producir un producto diazo coloreado que absorbe fuertemente a 540 nm¹⁰⁴.

Las muestras fueron obtenidas siguiendo los pasos ya mencionados en el punto 2.1.3.2. Este ensayo fue realizado por un tiempo total de 3 h, a cada hora de reacción se tomaron 100 μL de muestra de cada una de las condiciones evaluadas, se adicionan 50 μL de sulfanilamida al 2% (Merck, Darmstadt, Alemania) en HCl 5% (v/v) y 50 μL de una solución acuosa 0,1% de N-(1-naftil) etilendiamina (NEDD, SIGMA). Posteriormente, se incubó a 37 °C por 15 min en oscuridad, seguidamente se determinó espectrofotométricamente en un lector de Abs de microplacas (Sunrise, Tecan Trading AG). La Abs es directamente proporcional a la concentración de NO_2^- presentes en la muestra con respecto a la solución estándar empleada¹⁰⁵. Los resultados fueron expresados como μM de nitrato de sodio por mg de proteínas ($\text{NaNO}_2/\text{mg de P}$)^{54,94,102,105}.

2.3.3.1 Curva de calibración para NaNO_2

Mediante una solución stock de NaNO_2 10 mM, fueron preparadas diferentes soluciones a diferentes concentraciones (0,21 a 100 μM), posteriormente fueron medidas en un lector de Abs de microplacas (Sunrise, Tecan Trading AG) 540 nm, para construir una curva de calibración que permitiera determinar la cantidad de NO_2 en μM de las muestras. Esta concentración se determinó por extrapolación de la Abs en la curva de calibración y se expresó en función de las proteínas^{54,95,102}.

2.3.3.2 Determinación de ERN en presencia de secuestrante de NO

El CPTIO (Sigma), es una sal de potasio que reacciona con el NO para formar derivados CPTIO que inhiben la NOS. El procedimiento se realizó de acuerdo con lo descrito en el punto 2.1.3.2, con la adición de 1 mL de CPTIO 100 μ M antes de la incubación. A continuación, se procedió a determinar las ERN de acuerdo con lo descrito en el punto 2.3.3. Los resultados fueron expresados como % de formación de ERN respecto del control de cada condición.

2.3.4 Determinación de proteínas por el método de Bradford

Este método es rápido, preciso y permite la estimación de la concentración de proteínas presentes en una muestra. El ensayo se basa en la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 a la proteína, la cual provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm. Por lo tanto, la cantidad de proteína puede estimarse determinando la cantidad de colorante en la forma iónica azul¹⁰⁶.

La concentración de proteínas de todas las muestras estudiadas se realizó mediante el método de Bradford. Para esto, fue necesario construir una curva de calibración a partir del suero patrón Proti 2 Wiener Lab (0,036 a 0,156 mg/mL). Se tomaron 100 μ L de las muestras y se adiciono 100 μ L de reactivo de Bradford. Seguidamente se midió la absorbancia en un lector de microplacas (Sunrise, Tecan Trading AG) a 595 nm. La concentración de las proteínas medidas se determinó interpolando los valores de Abs obtenidos versus la curva de calibración¹⁰².

2.4 Efecto del CO₂ en marcadores de estrés oxidativo

Cada erlenmeyer contenía 20 mL de caldo LB, 1 mL de CIP o de PBS para el control y las condiciones de CO₂ ya descritas. Estos fueron llevadas al Shaker a 37 °C por un tiempo total de 4 h, tomando muestra a los tiempos 0, 2 y 4 h de incubación.

2.4.1 Evaluación de la peroxidación lipídica

El MDA es en muchos casos el aldehído más expresado en el proceso de peroxidación lipídica, y su determinación con ácido tiobarbitúrico (TBA) es uno de los ensayos más utilizados para este tipo de estudio. El MDA al reaccionar con TBA genera un producto de color rojo que absorbe a 535 nm¹⁰⁷.

Para la determinación de la oxidación de lípidos se tomó 1 mL de muestra de cada condición estudiada, se adiciono 1 mL de ácido tricloroacético (TCA, Anedra) al 35% (v/v) para precipitar las proteínas y se llevó a incubar a temperatura ambiente por 20 min en oscuridad. A continuación, se agregó 1 mL de TBA (SIGMA) al 0,5% (p/v) en agua destilada y se llevó a baño maría a 80 °C durante 30 min. Pasado este tiempo se enfrió en un baño de hielo, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 535 nm en un lector de microplacas (Sunrise, Tecan Trading AG). Los resultados fueron expresados como % de variación de MDA respecto del control de cada condición^{51,102,108}.

2.4.2 Determinación de los AOPP

Los productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP) se han convertido en marcadores de estrés oxidativo confiables, ya que la oxidación de residuos aminoácidos tales como tirosina, conducen a la formación de ditirosina, agregación de proteína, entrecruzamiento y fragmentación, así como a la formación de puentes disulfuro e incremento de la susceptibilidad a la proteólisis

por lo que el estrés oxidativo puede verse reflejado en la oxidación de proteínas¹⁰⁹.

Los niveles de AOPP fueron medidos por espectrofotometría usando la Cloramina T (50 μ M) como testigo, en presencia de ioduro de potasio (IK, 1,16 M) que absorbe a 340 nm, definiendo así un índice de AOPP¹¹⁰.

Se tomaron 100 μ L de muestra de cada condición, se adiciono 50 μ L de IK y 50 μ L de ácido acético (CH₃COOH). Posteriormente se llevó al lector de microplacas (Sunrise, Tecan Trading AG) para determinar la absorbancia. Los resultados fueron expresados como % de variación de AOPP respecto del control de cada condición^{108,111,112}.

2.4.3 Determinación del potencial de membrana

Se estudiaron los cambios en el potencial de membrana mediante el uso del 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS), el cual es una sonda fluorescente utilizada para detectar cambios conformacionales en proteínas y estudiar membranas biológicas¹¹⁰.

Se tomaron 100 μ L de cada una de las muestras estudiadas y se adicionaron 40 μ L de ANS (60 pM). Posteriormente, se incubaron por 20 min a temperatura ambiente. La fluorescencia fue medida en un espectrofluorómetro Biotek sinergia HT a longitudes de onda de excitación y emisión 360 y 520 nm, respectivamente. Los resultados fueron expresados como % de variación del potencial de membrana con respecto del control de cada condición^{113,114}.

2.4.4 Determinación del daño al ADN

Las muestras fueron preparadas según lo descrito en el punto 2.1.3.2 por un tiempo total de 2 h de incubación.

2.4.4.1 Extracción y purificación de nucleósidos

Las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 15 min, para luego ser resuspendidas en buffer PBS estéril (1,5 mL), posteriormente se empleó el kit de EasyPure bacterial genomic DNA, para extraer el ADN. Se siguió las instrucciones del fabricante hasta obtener el ADN libre de impurezas (relación $Abs_{260}/Abs_{280} > 1,8$). A continuación, para obtener los nucleósidos, 100 μ g del ADN se resuspendieron en 200 μ L de buffer TRIS-HCl 0,01 M (pH 7). Posteriormente, se le agregó 5 U de la enzima nucleasa P1 disuelta en 10 μ L de acetato de sodio 0,5 M (pH 5,1) y se llevó a incubar durante 1 h en oscuridad a 37 °C. Pasado este tiempo se agregaron 3 U de la enzima fosfatasa alcalina disuelta en 80 μ L de TRIS-HCl 0,4 M (pH 7,5) y se llevó nuevamente a incubar a 37 °C durante 1 h en la oscuridad^{51,113}.

2.4.4.2 Cuantificación del nucleósido 8-OHdG

Por último, tanto las muestras tratadas como el control fueron llevadas al HPLC (Jasco) en una columna Restek, y fueron corridas en una fase móvil de buffer (citrato de sodio, acetato de sodio a pH 5,1) - metanol en proporciones 93:7. Las muestras se midieron a una longitud de onda de 254 nm, para ser cuantificadas. Como testigos se empleó 1 mM de dG y 8-OHdG, nucleósido no oxidado y oxidado, respectivamente. Los resultados fueron expresados por medio de la relación de 8-OHdG/dG¹¹⁵.

2.5 Efecto del CO₂ sobre las AXO

Preparación del inoculo: se utilizó la misma cepa de *E. coli*, en las condiciones ya mencionados en el punto 2.1.1.

La preparación de las muestras se realizó según lo descrito en el punto 2.1.3.2, las determinaciones fueron realizadas a 0, 2 y 4 h de incubación.

2.5.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos

2.5.1.1 Determinación cuantitativa de la actividad de superóxido dismutasa

La enzima SOD produce la dismutación de O₂^{•-} a H₂O₂. La riboflavina en presencia de luz pierde un electrón y dispara la generación de O₂^{•-} he inmediatamente es atacado por el NBT agregado, el cual compite con la enzima SOD presente en la muestra por el O₂^{•-}. A mayor actividad SOD, menor es la reducción del NBT^{116,117}.

Las muestras recolectadas se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 min y se separó el sobrenadante, obteniendo la fracción de SOD extracelular (SODe). Los precipitados se resuspendieron en 0,5 mL de PBS estéril, para conseguir la SOD intracelular (SODi). Seguidamente se tomó 100 µL de la fracción extracelular o intracelular se adicionó 300 µL de metionina (sigma) 13 mM, 300 µL EDTA 100 nM, 300 µL de riboflavina (Sigma) 2 µM en PBS, 100 µL de NBT en DMSO (Anedra) 75 µM. Las muestras fueron llevadas a luz fluorescente de 20 W durante 6 min para favorecer la reacción. Pasado este tiempo fueron llevadas al espectrofotómetro para su lectura a una longitud de onda de 575 nm. Se define como una unidad de actividad SOD a la cantidad de enzima requerida para disminuir en un 50% la producción de NBT reducido. Los resultados fueron expresados como unidades de SOD y relativizaron en función de los mg de proteína (U.SOD/mg de P)^{99,103,105,118}.

2.5.1.2 Determinación cuantitativa de la actividad de catalasa

Se tomaron 2 mL de solución de H_2O_2 (0,2 M) a la cual se le agregó 2,5 mL de PBS estéril y 0,5 mL de la suspensión obtenida en el punto 2.1.1. Posteriormente, a 1 mL de cada mezcla se le agregaron 2 mL de dicromato de potasio (K_2CrO_7 2% en ácido acético glacial CH_3COOH) y se llevó a incubar a 100 °C por 2 min. Posteriormente, fueron enfriadas en baño de hielo. De cada muestra se tomó 200 μL para su determinación espectrofotométrica en un lector de microplacas (Sunrise, Tecan Trading AG), la absorbancia fue determinada a 570 nm¹¹⁹. Una unidad de CAT desdobra 1 μM de H_2O_2 por min a 25 °C y pH 7,0. Los resultados fueron expresados como unidades de CAT por mg de proteína (U.CAT/mg de P)^{112,120}.

2.5.2 Sistemas antioxidantes no enzimáticos

2.5.2.1 Determinación cuantitativa de glutatión reducido

Para este ensayo se utilizó el reactivo de Ellman (ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzoico), el cual en presencia de GSH reacciona para formar un compuesto que se lee espectrofotométricamente a 412 nm¹¹⁴.

Se tomaron alícuotas de 100 μL de cada una de las condiciones de reacción y se adicionó 20 μL de GR (6 U/mL), 50 μL de NADPH (4 mg/mL) y 20 μL de ácido DNTB 1,5 mg/mL. Posteriormente, se llevó a incubar a temperatura ambiente durante 20 min. Seguidamente, las muestras fueron llevadas al lector de microplacas (Sunrise, Tecan Trading AG) y se determinó la Abs. Los valores de Abs se relativizaron a las proteínas, y los resultados se expresaron como mM de GSH por mg de proteínas (mM de GSH/mg de P)^{88,120}.

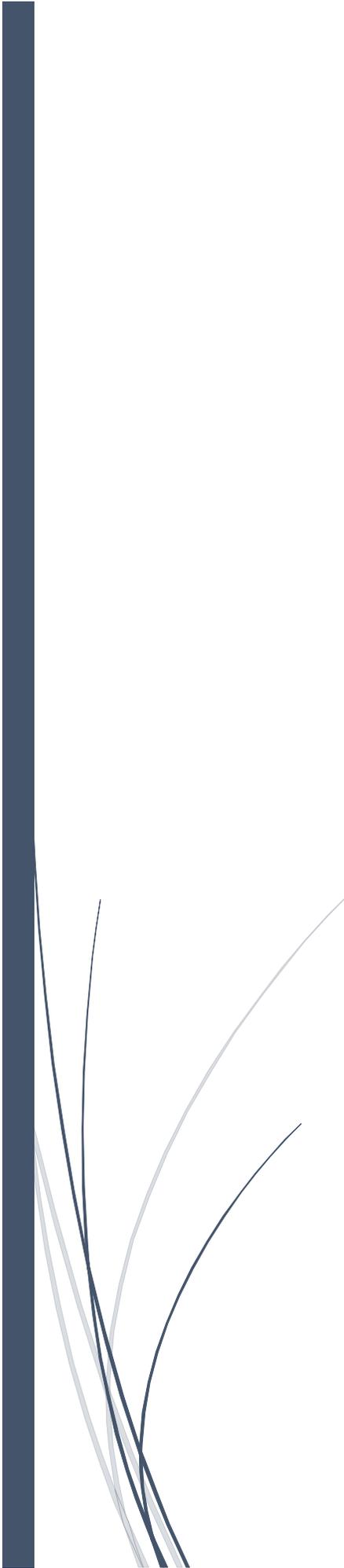
2.5.2.2 Determinación de la actividad antioxidante total

El poder reductor del hierro total (FRAP), es un método que evalúa el poder antioxidante total de una muestra, de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}), que tiene un máximo de absorbancia a una longitud de onda 593 nm¹²¹.

El ensayo se llevó a cabo por un tiempo total de 4 h tomando muestras a los tiempos 0, 2 y 4 h de reacción. Se preparo el reactivo de trabajo con 2,5 mL de buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3,6); 2,5 mL de solución TPTZ 10 mM (Sigma) en HCl 40 mM y 0,25 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM en relación 10:1:1. Se utilizaron 150 μL de esta solución y se agregaron a 50 μL de muestra. Pasados 10 min de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm. La curva de referencia se construyó utilizando soluciones conocidas de Fe^{+2} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) como patrón primario. Los resultados fueron expresados como μM de sulfato de hierro por mg de proteína (μM de FeSO_4/mg de P)^{103,112,117}.

2.6 Análisis estadístico

El procesamiento de los datos fue realizado mediante análisis de ANOVA de una sola vía t-student. Los datos fueron representados como la media \pm la desviación estándar (DE). Los ensayos fueron realizados por triplicado, en tres ensayos diferentes. En todos los casos, las diferencias fueron consideradas significativas para una probabilidad (p) menor a 0,05.



Capítulo 3

Resultados

Este capítulo está dividido en cuatro subtemas:

- Efecto del CO₂ sobre el crecimiento bacteriano
- Determinación de ERO y ERN
- Daño oxidativo sobre macromoléculas
- AXO

3.1 Efecto del CO₂ sobre el crecimiento bacteriano

Se estudió el efecto de CIP a concentraciones de 0,5 y 50 µg/mL frente a *E. coli* ATCC 25922, tanto en CA como en atmósferas controladas de CO₂.

En la Figura 7 se muestra la curva de crecimiento de la bacteria, UFC/mL en función del tiempo, tanto en CA como de CO₂. Se pudo ver que el CO₂ favorece el crecimiento bacteriano con respecto a las CA, presentando aumento significativo (*p<0,005) de $(2,24 \pm 0,15) \times 10^{16}$ y $(5,94 \pm 0,20) \times 10^{15}$ UFC/mL para CO₂ de 50 y 50.000 ppm, respectivamente, en las 8 h de incubación.

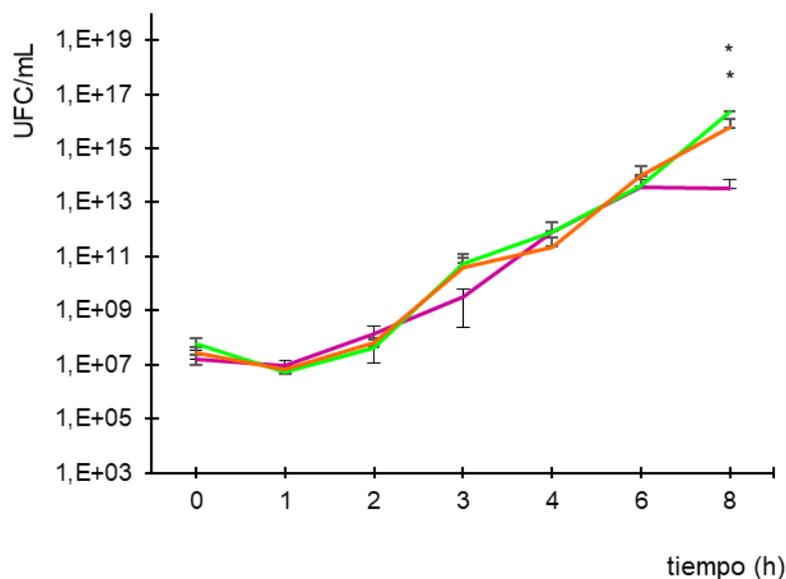


Figura 7. **Curva de crecimiento de *E. coli* en CA (—), CO₂ 50 ppm (—) y CO₂ 50.000 ppm (—).** Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las líneas representan la media ± DE, *p<0,05 respecto de CA.

En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos de la curva de muerte de *E. coli*, frente a las dos concentraciones de CIP en CA. Los valores fueron expresados como UFC/mL en función del tiempo, donde se observó una disminución de 2 órdenes de magnitud para ambas concentraciones de CIP, partiendo de $(8,00 \pm 0,18) \times 10^5$ hasta $(6,00 \pm 0,22) \times 10^3$ UFC/mL para CIP 0,5 µg/mL y de $(8,00 \pm 0,13) \times 10^6$ hasta $(2,00 \pm 0,16) \times 10^4$ UFC/mL para CIP 50 µg/mL.

Con CIP 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó un descenso gradual de UFC/mL a partir de las 3 h de incubación, hasta las 8 h de incubación; mientras que con CIP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el descenso de UFC/mL fue desde la hora de incubación hasta las 8 h.

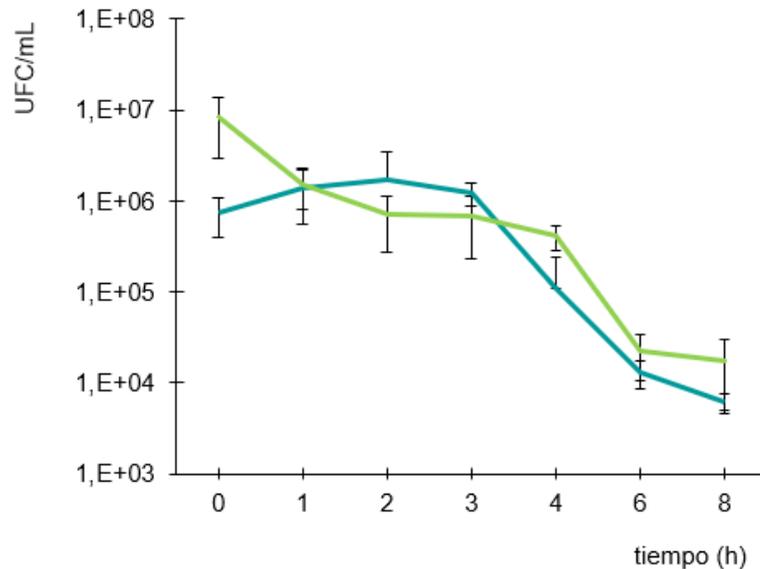


Figura 8. Curva de muerte de CIP frente a *E. coli* en CA. (—) CIP 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y (—) CIP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las líneas representan la media \pm DE.

La acción de CIP en condiciones de CO_2 se muestra en la Figura 9 y los valores fueron expresados como UFC/mL en función del tiempo. Se observó como el CO_2 , modificó la acción de CIP sobre *E. coli*, vista en CA (Figura 8), perdiendo la capacidad de disminuir las UFC/mL observada desde la primera y tercera hora de incubación de $(2,00 \pm 0,22) \times 10^6$ UFC/mL y $(1,00 \pm 0,14) \times 10^6$ UFC/mL, para CIP 50 y 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

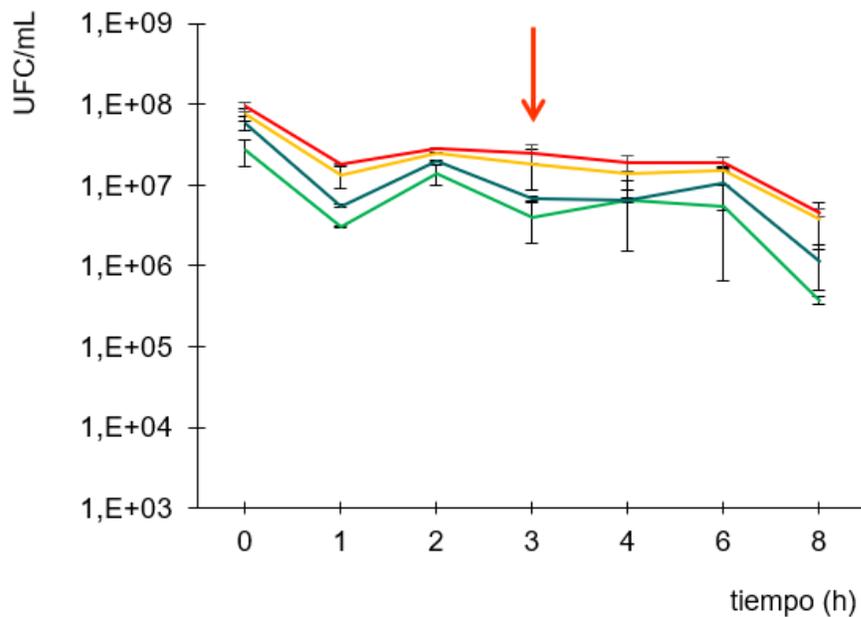


Figura 9. **Curva de muerte de CIP frente a *E. coli* en condiciones de CO₂ modificadas.** (—) CO₂ 50ppm + CIP 0,5 µg/mL, (—) CO₂ 50 ppm + CIP 50 µg/mL, (—) CO₂ 50.000 ppm + CIP 0,5 µg/mL, (—) CO₂ 50.000 ppm + CIP 50 µg/mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las líneas representan la media ± DE.

3.2. Determinación de ERO

Es importante estudiar la formación de ERO cuando se está evaluando la acción de ATB. Es conocido que éstos, tienen la capacidad de estimular la formación de ERO, desencadenando múltiples efectos en la célula bacteriana ayudando al mecanismo de acción principal del ATB a generar la muerte celular^{52,54}.

3.2.1 Método espectrofotométrico con NBT

Se empleó el ensayo de NBT para cuantificar O₂^{•-} presente en las muestras. En la Figura 10, se muestran los resultados obtenidos a las 2 h incubación, debido a que este fue el tiempo de mayor formación de dicha especie en *E. coli*.

Ambas concentraciones de CO₂ disminuyeron significativamente la capacidad de CIP para formar ERO respecto de las CA (*p<0,05), $(3,25 \pm 0,12) \times 10^{-8}$ y $(4,96 \pm 0,14) \times 10^{-8}$ ERO/UFC.mL⁻¹, estos valores representaron una disminución de ERO de 57 y 73% con CIP 0,5 µg/mL y 50 µg/mL respectivamente, en concentraciones de CO₂ 50 ppm. En CO₂ 50.000 ppm la reducción con respecto de las CA fue de $(2,81 \pm 0,15) \times 10^{-8}$ y $(2,87 \pm 0,21) \times 10^{-8}$ ERO/UFC.mL⁻¹, éstos valores representaron una disminución de ERO de 80 y 86% con CIP 0,5 µg/mL y CIP 50 µg/mL respectivamente.

Por lo tanto, esta disminución en la formación de ERO mediada por CIP fue dependiente tanto de la concentración de CO₂, como de CIP. Cabe resaltar que la capacidad de CIP para formación ERO fue significativamente diferente (*p<0,05) en CA y de CO₂, así como entre cada concentración de CIP y CO₂ estudiadas (#p<0,05).

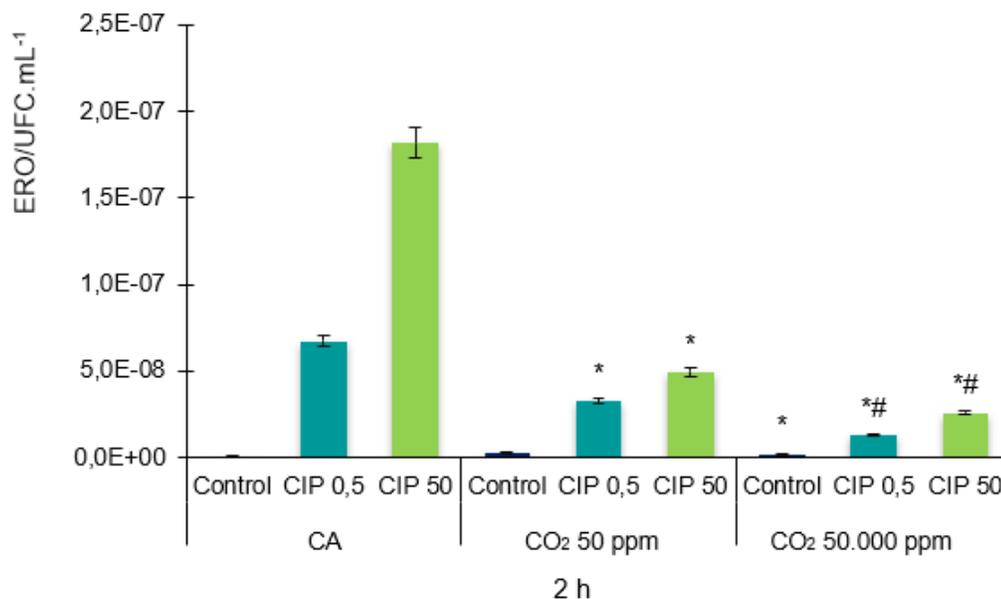


Figura 10. **Determinación de la formación de ERO mediada por CIP en CA y de CO₂ por reducción de NBT.** Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las barras representan la media \pm DE. *p<0,05 respecto de CIP en CA. #p<0,05 respecto de la misma concentración de CIP y diferente de CO₂.

3.2.2 Método espectrofluorométrico con H₂-DCFDA

Para complementar los resultados obtenidos con el ensayo de NBT Se cuantificó las ERO por fluorimetría utilizando la sonda H₂-DCFDA, ya que ésta permite determinar las ERO intracelulares. La Figura 11, muestra los resultados obtenidos a las 2 h de incubación, ya que este fue el tiempo de mayor formación de ERO, tanto en CA como de CO₂.

Los resultados obtenidos por espectrofluorimetría coincidieron con los observados en el ensayo del NBT. Ambas concentraciones de CIP en CA favorecieron una mayor formación de ERO. Mientras que CIP en condiciones de CO₂ disminuyó de forma significativa (*p<0,05), la formación de ERO respecto de las CA. Altas concentraciones de CO₂ generó la menor formación de ERO de $(6,06 \pm 0,10) \times 10^{-5}$ y $(3,00 \pm 0,15) \times 10^{-5}$ u.a de ERO/UFC.mL⁻¹, lo que equivale a 93 y 99% con CIP 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente en comparación con las CA.

También se encontraron diferencias significativas (#p<0,05) en la formación de ERO entre las dos concentraciones de CIP ensayadas, respecto de cada condición de CO₂. Cabe destacar que la formación de ERO fue dependiente de la tanto de la concentración de CIP como de CO₂.

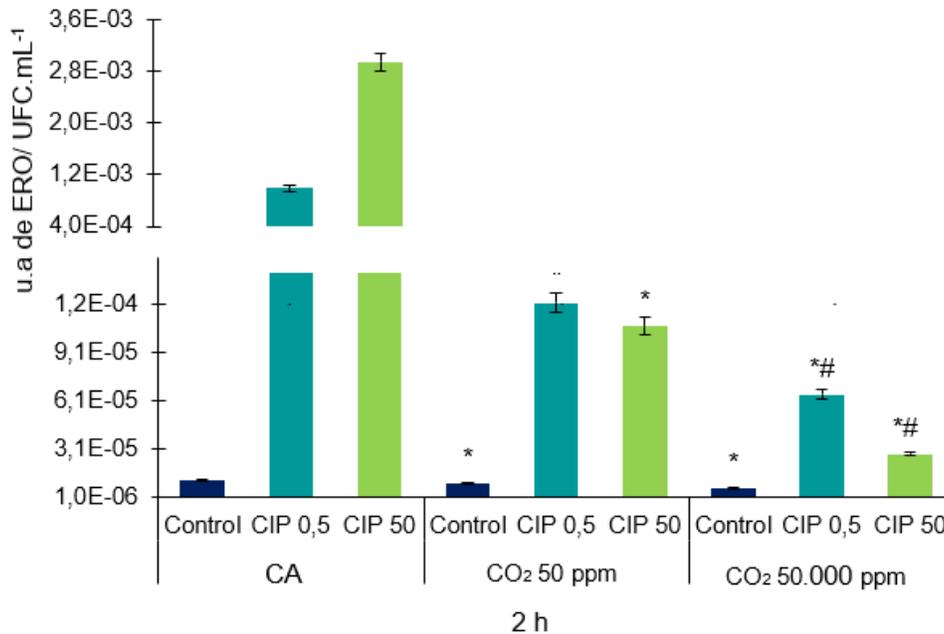


Figura 11. **Determinación de la formación de ERO generadas por CIP en CA y de CO₂ por espectrofluorométrica.** Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las barras representan la media \pm DE. * $p < 0,05$ respecto de CIP en CA. # $p < 0,05$ respecto de la misma concentración de CIP y diferente de CO₂.

3.2.2.1 Generación de ERO en presencia de secuestrantes

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo mediante el cual el CO₂ influye en la formación de ERO mediada por CIP en *E. coli*, se incorporó secuestrantes de ERO tanto en CA como de CO₂, para determinar cómo este último puede llegar a interferir en estos procesos oxidativos.

Para llevar a cabo estos ensayos se estudió la formación de ERO por medio de la técnica espectrofluorométrica con la sonda H₂-DCFDA, se decidió emplear esta técnica debido a su sensibilidad. Los secuestrantes empleados fueron Tirón para inhibir la formación del O₂^{•-} y 2,2'-dipiridil que inhibe la reacción de Fenton, los resultados que se muestran a continuación, son los obtenidos a las 2 h de incubación, ya que este fue el tiempo máximo de generación de ERO.

- Efecto del Tirón como secuestrante

Los resultados obtenidos de este ensayo en CA y de CO₂ se muestran en la Figura 12, comparando el porcentaje de formación de ERO de cada condición con respecto a su control sin CIP. Se pudo observar que el O₂^{•-} participa activamente en el estrés oxidativo generado por CIP en CA, debido a la disminución significativa (*p<0,05) de ERO, la cual fue de 20 y 34% para CIP 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente en comparación con la condición sin Tirón.

En atmósferas controladas de CO₂ también se observó una disminución significativa (*p<0,05) en la formación de ERO, inducida por CIP en presencia del secuestrante, pero este comportamiento dependió de la concentración de CO₂ y de CIP. En concentraciones de CO₂ 50 ppm solo se observó una disminución de 32% de ERO para CIP 50 µg/mL con respecto de CIP sin Tirón. Mientras que en CO₂ 50.000 ppm esta disminución fue de 16 y 44% para CIP 0,5 y 50 µg/mL respectivamente, en comparación con la condición sin secuestrante (*p<0,05).

Por lo tanto, el CO₂ modifica la formación del O₂^{•-} inducido por CIP, de forma dependiente de la concentración de CO₂ y de CIP, observándose un mayor efecto del secuestrante a concentraciones de CO₂ y de CIP altas (CO₂ 50.000 ppm, CIP 50 µg/mL) de 16 y 44% respecto de CIP sin Tirón en CA (*p<0,05).

Estos resultados indican que el O₂^{•-} es una especie que participa activamente en el estallido respiratorio a tiempos cortos en *E. coli*, ya que esta es la primera ERO en formarse. Además, se observó diferencias significativas entre las muestras tratadas con CIP-Tirón en condiciones de CO₂, respecto a CIP-Tirón en CA (#p<0,05).

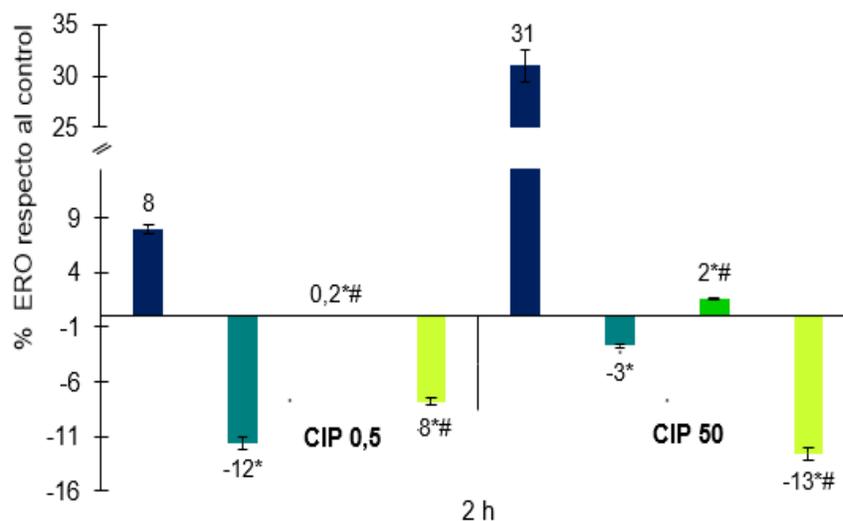


Figura 12. **Efecto del Tirón como secuestrante de ERO.** (■) CIP, (■) CIP-Tirón, (■) CIP-Tirón CO₂ 50 ppm, (■) CIP-Tirón CO₂ 50.000 ppm. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las barras representan el porcentaje de formación de ERO respecto de los controles de cada condición. * $p < 0,05$ respecto de CIP sin Tirón. # $p < 0,05$ respecto de CIP-Tirón y CIP-Tirón CO₂.

- Efecto del 2,2'-dipiridil como secuestrante

Al igual que el punto anterior, se graficó el porcentaje de formación de ERO con respecto al control de cada condición sin CIP. En la Figura 13 se observó como en CA, el 2,2'-dipiridil generó una disminución de ERO de 1 y 5% para CIP 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente en comparación con CIP sin 2,2'-dipiridil. Sugiriendo que las ERO inducidas por CIP en CA a tiempo de 2 h, no son formadas por la vía de la reacción de Fenton, ya que posiblemente esta reacción se presenta a tiempos más prolongados.

Para las condiciones de CO₂ esta disminución de ERO fue más marcada. Observándose una reducción en la formación de ERO respecto de CIP sin 2,2'-dipiridil de 107 y 52% para CIP 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente en condiciones de CO₂ 50 ppm (* $p < 0,05$). Para CO₂ 50.000 esta reducción fue de 33 y 52 % para CIP 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente en comparación con CIP sin 2,2'-dipiridil

(* $p < 0,05$). Por lo tanto, la formación del HO[•] por la vía de Fenton a tiempos cortos, fue una vía muy importante para la generación de ERO inducida por CIP en presencia de CO₂, indicando que el CO₂ no solo disminuye las ERO, sino que también modifica las rutas de formación de éstas.

Se observaron diferencias significativas entre las muestras tratadas con CIP en presencia del secuestrante y sin el secuestrante (* $p < 0,05$), como entre CIP con 2,2-dipiridil en condiciones de CO₂ y CA (# $p < 0,05$). Por lo tanto, el HO[•] fue la ERO que más formada por CIP en ambas concentraciones de CO₂ sobre *E. coli*.

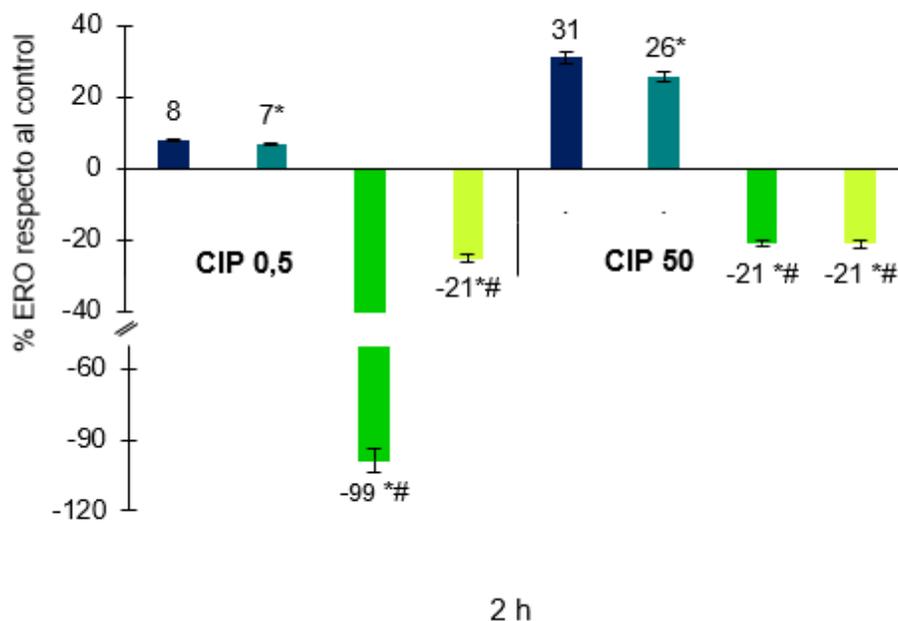


Figura 13. **Efecto del 2,2'-dipiridil como secuestrante de ERO.** (■) CIP, (■) CIP-2,2'-dipiridil, (■) CIP-2,2'-dipiridil CO₂ 50 ppm, (■) CIP-2,2'-dipiridil CO₂ 50.000 ppm. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las barras representan la formación de ERO respecto de los controles de cada condición. * $p < 0,05$ respecto de CIP sin 2,2'-dipiridil. # $p < 0,05$ respecto de CIP-2,2'-dipiridil y CIP-2,2'-dipiridil-CO₂.

3.3 Determinación de ERN por el método de GRIESS

Esta técnica permitió determinar la formación de ERN estimuladas por la acción de CIP tanto en CA como de CO₂, por un tiempo total de 2 h de incubación, ya que este fue el tiempo de mayor estímulo de dichas especies.

La Figura 14 muestra la capacidad de CIP para generar ERN en CA y de CO₂. Se pudo observar que en CA ambas concentraciones de CIP permanecieron debajo del control, al igual que en CO₂ 50.000 ppm. En condiciones de CO₂ 50 ppm se observó un aumento significativo (*p<0,05) de ERN respecto de su control y de las CA (#p<0,05); dicho aumento fue de $85 \pm 0,02$ y $82 \pm 0,00$ $\mu\text{M NaNO}_2/\text{mg}$ de proteína para CIP 0,5 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente en comparación con CA.

Cabe destacar que, aunque en condiciones de CO₂ 50.000 ppm el control siempre se encuentre por encima de ambas concentraciones de CIP, si fue posible observar un aumento significativo (#p<0,05) de $83 \pm 0,02$ y $85 \pm 0,03$ $\mu\text{M NaNO}_2/\text{mg}$ de proteína para CIP 0,5 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente en comparación con las CA. Sugiriendo que el estrés oxidativo causado por CIP en CA se vio modificado por la presencia de CO₂ en ambas concentraciones, disminuyendo la formación de ERO y aumento la formación de ERN.

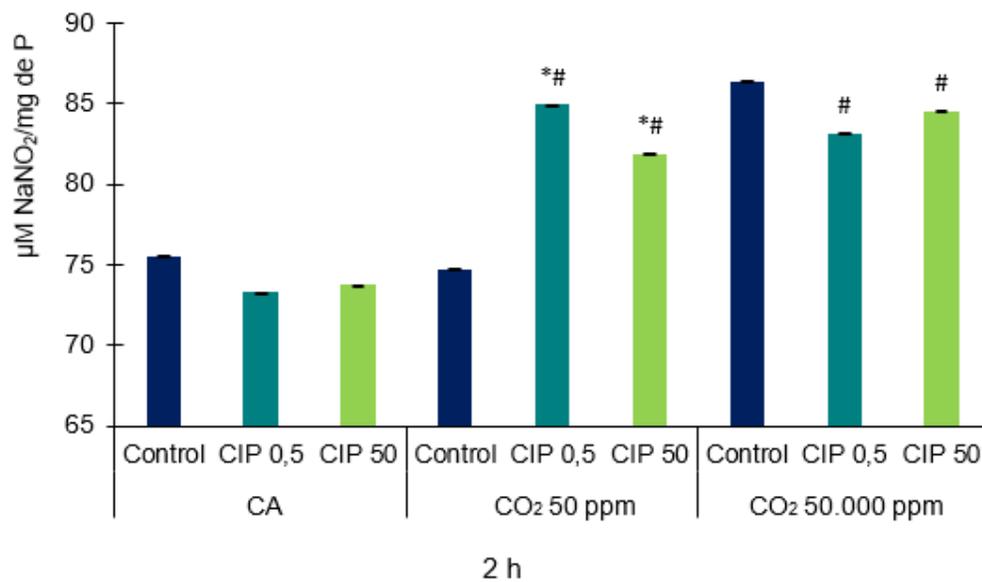


Figura 14. **Determinación de la formación de ERN en *E. coli* frente a CIP en CA y de CO₂ por la técnica de Griess.** Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las barras representan la media \pm DE. * $p < 0,05$ respecto del control de cada condición. # $p < 0,05$ respecto de CIP-CA y CIP-CO₂.

3.3.1 Determinación de ERN en presencia de secuestrantes

Debido a los resultados anteriores, fue interesante conocer como el CO₂ interfiere en la formación de ERN por parte de CIP, por lo que se empleó un secuestrante específico para NO como CPTIO. Además, se estudió la participación del O₂⁻ en la producción de ERN empleando el Tirón. Estos ensayos se realizaron con el fin de poder determinar si éstas especies intervienen en los cambios generados por CO₂ en la acción de CIP sobre *E. coli*.

- Efecto del Carboxi-PTIO como secuestrante

Los resultados de este ensayo fueron obtenidos a las 2 h de incubación y se muestran en la Figura 15, donde se observó para las CA y CPTIO una disminución de ERN de 4 y 7% para 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente en comparación con CIP sin secuestrante (* $p < 0,05$), indicando que la participación del NO en la formación de ERN inducidas por CIP en CA fue moderada, lo cual es

de esperarse ya que se ha descrito que CIP estimula en mayor medida la formación de ERO, que ERN.

En condiciones de CO₂ se observó un efecto contrario al visto en CA. La participación del NO en la formación de ERN inducidas por CIP en condiciones de CO₂, parece ser una vía importante de generación de dichas especies. Se encontró que para CO₂ 50 ppm, hubo una disminución significativa (*p<0,05) de ERN solo para 0,5 µg/mL de 88%. Mientras que en CO₂ 50.000 ppm esta disminución fue de 27 y 32% para 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente en comparación con CIP sin secuestrante (*p<0,05).

Se observaron diferencias significativas entre las muestras de CIP tratadas con CPTIO y sin CPTIO(*p<0,05), como también entre CIP-CPTIO en CA respecto del CO₂(#p<0,05). Estos resultados indican que el CO₂ modifica la capacidad de CIP para formación de ERN, favoreciendo la producción del NO y este aumento fue mayor en altas concentraciones de CO₂ y CIP.

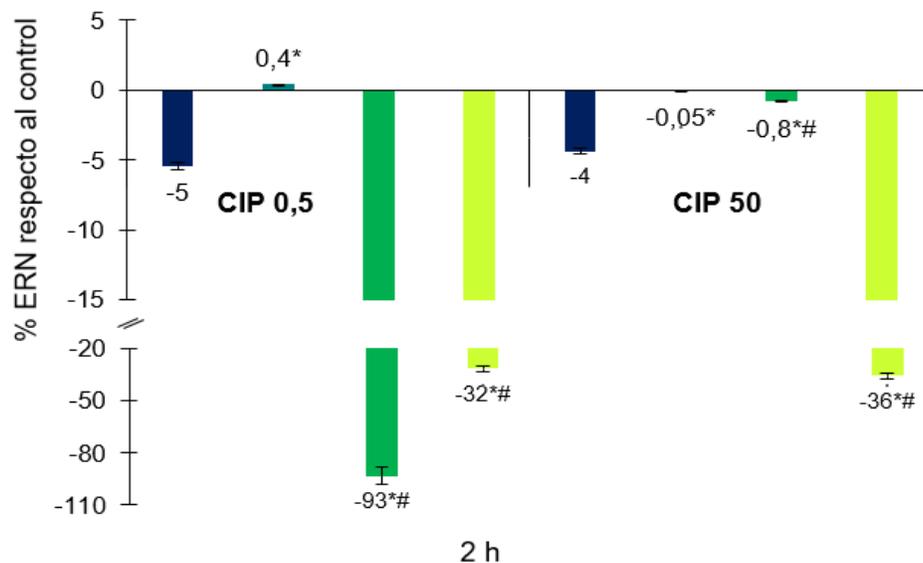


Figura 15. Efecto del de CPTIO como secuestrante de ERN. (■) CIP, (■) CIP-CPTIO, (■) CIP-CPTIO CO₂ 50 ppm, (■) CIP-CPTIO CO₂ 50.000 ppm. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las barras representan el porcentaje de formación de ERN con respecto a los controles de cada condición. *p<0,05 respecto de CIP sin CPTIO. #p<0,05 respecto de CIP-CPTIO y CIP-CPTIO CO₂.

- Efecto del Tirón como secuestrante

La Figura 16 muestra los resultados obtenidos tanto en CA como de CO₂ a las 2 h de incubación, se observó que para las CA el O₂^{•-} no parece ser una especie involucrada en la formación de ERN inducidas por CIP, ya que se observó un aumento de ERN. Lo cual puede deberse a que el O₂^{•-} es neutralizado rápidamente por la SOD, por lo tanto, la posibilidad de participar en la formación de ERN es menor.

En atmósferas controladas de CO₂, la participación del O₂^{•-} en la formación de ERN fue dada en ambas concentraciones de CO₂, por la mayor concentración de CIP. En CO₂ 50 ppm la disminución de ERN fue de 6% respecto de CIP sin secuestrante (*p<0,05); mientras que en CO₂ 50.000 ppm esta disminución fue del 2% respecto a CIP sin secuestrante (*p<0,05). También, se destacan diferencias significativas entre las muestras de CIP tratadas con Tirón y sin Tirón (*p<0,05), como entre CIP-Tirón en CA y de CO₂ (#p<0,05). Estos resultados indican que el CO₂ modifica la capacidad de CIP para formar ERN por medio del consumo de O₂^{•-}.

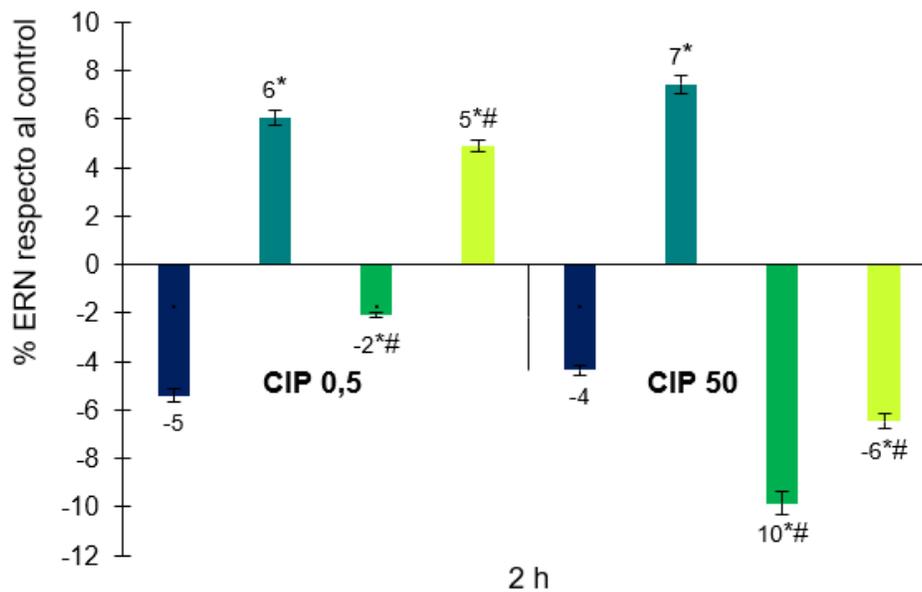


Figura 16. **Efecto del Tirón como secuestrante de ERN.** (■) CIP, (■) CIP-Tirón, (■) CIP-Tirón CO₂ 50 ppm, (■) CIP-Tirón CO₂ 50.000 ppm. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las barras representan el porcentaje de formación de ERN con respecto a los controles de cada condición. * $p < 0,05$ respecto de CIP sin Tirón. # $p < 0,05$ respecto de CIP-Tirón y CIP-Tirón CO₂.

Se investigó si había reducción de ERO por aumento de ERN, para lo cual se calculó la relación ERO/ERN a las diferentes concentraciones de CIP. En la Tabla 1 se observa que la relación ERO/ERN fue mayor con CIP 50 $\mu\text{g/mL}$ en CA.

Para las condiciones de CO₂, esta relación fue menor con respecto a las CA, siendo de 78 y 82% menor en ambas concentraciones de CIP en presencia de CO₂ 50 y 50.000 ppm, respectivamente. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo mediado por CIP se ve modificado en condiciones de CO₂. La relación ERO/ERN se ve reducida en condiciones de CO₂ debido, principalmente, a una reducción en la formación de ERO en ambas concentraciones de CIP estudiadas frente a *E. coli*.

Tabla 1. Relación de ERO y ERN en *E. coli* incubadas en CA y de CO₂.

Condición	CIP (µg/mL)	ERO (u.a./mg de P)	ERN (µMNaO ₂ /mg de P)	ERO/ERN
CA	0	3349 ± 82,02	75 ± 0,01	44
	0,5	3618 ± 91,92	74 ± 0,00	49
	50	4386 ± 49,50	73 ± 0,01	60
CO ₂ 50 ppm	0	914 ± 31,11	75 ± 0,04	12
	0,5	1013 ± 21,92*	85 ± 0,01*	12
	50	1120 ± 29,70*	90 ± 0,00	12
CO ₂ 50000 ppm	0	844 ± 40,30	86 ± 0,01	10
	0,5	819 ± 06,36*#	83 ± 0,01*	10
	50	881 ± 20,50*#	85 ± 0,01	10

*p<0,05 respecto de CIP en CA. #p<0,05 respecto de la misma concentración de CIP y diferente de CO₂.

3.4 Efecto del CO₂ en el daño oxidativo sobre macromoléculas

3.4.1 Evaluación de la peroxidación lipídica

Los resultados obtenidos en la Figura 17 nos indican que en *E. coli*, la peroxidación lipídica fue dependiente de la concentración de CIP en CA y de CO₂ 50 ppm, en condiciones más altas de CO₂, CIP no induce peroxidación lipídica en *E. coli*.

En CA se vio una participación diferente entre las concentraciones de CIP para generar peroxidación lipídica en *E. coli*, ya que CIP 0,5 µg/mL no estimula la formación de MDA con respecto al control, mientras que CIP 50 µg/mL aumenta la formación de MDA en un 9% con respecto al control.

En condiciones de CO₂ 50 ppm la peroxidación lipídica fue mayor a la observada en CA (*p<0,05), con un aumento en la producción de MDA del 43 y 30% para CIP 0,5 y 50 µg/mL. Para CO₂ 50.000 ppm solo se observó aumento de MDA para CIP 0,5 µg/mL del 20%, respecto de las CA (*p<0,05). Cabe destacar que entre más alta fue la concentración de CO₂ y CIP, menor fue el daño causado en los lípidos de la célula bacteriana.

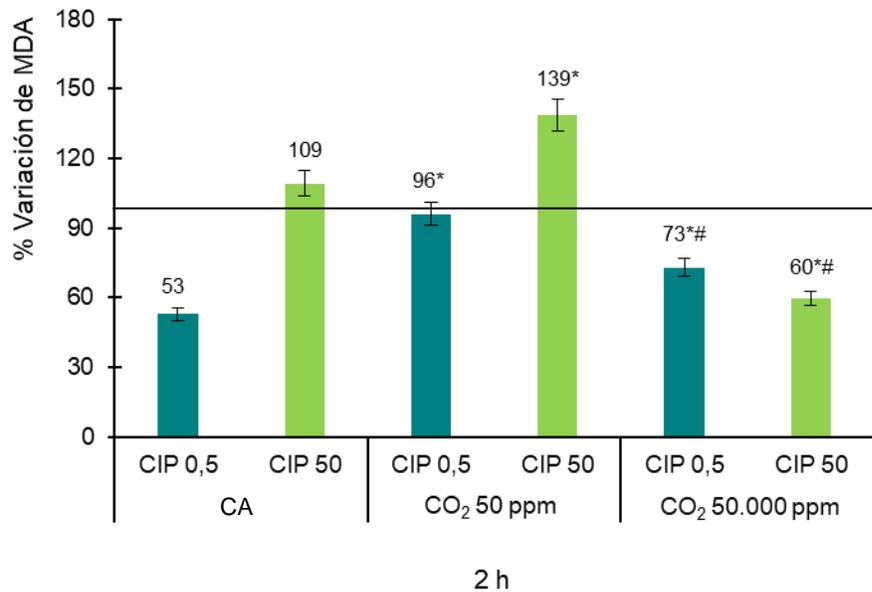


Figura 17. **Ensayo de peroxidación lipídica.** (—) representa el 100% del valor del control de cada condición, (■) CIP 0,5 µg/mL, (■) CIP 50 µg/mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las barras representan el porcentaje de variación de lípidos con respecto del control de cada condición, a las 2 h de incubación en CA y CO₂. *p<0,05 respecto de las CA. #p<0,05 respecto de cada concentración de CIP en condiciones de CO₂.

3.4.2 Evaluación de la oxidación de proteínas

La formación de AOPP fue estudiada al tiempo de mayor formación de ERO (2 h) para poder determinar las posibles variaciones en la acción de CIP tanto en CA como de CO₂ (Figura 18). Los resultados obtenidos en este ensayo indicaron que la capacidad de CIP para oxidar proteínas en CA fue dependiente de la concentración de CIP, ya que CIP 0,5 µg/mL generó un 8% menos de oxidación de proteínas respecto del control, siendo el caso contrario para CIP 50 µg/mL

donde se observó una mayor oxidación de proteínas en un 5% respecto del control.

Con respecto a las condiciones de CO₂, se pudo observar niveles más altos de oxidación de proteínas con respecto de las CA, los cuales fueron dependientes de la concentración de CIP y de CO₂. En CO₂ 50 ppm se observó un aumento de los niveles de oxidación de proteínas de 45 y 87% mayor, en comparación con las CA (*p<0,05) para CIP 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente. Mientras que para CO₂ 50.000 ppm estos niveles fueron menores a los observados en CO₂ 50 ppm, pero siguen siendo 38 y 44% mayor que los vistos en CA (*p<0,05) para CIP 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente. Por lo tanto, el CO₂ favorecería la oxidación de proteínas de manera dependiente de la concentración de CIP.

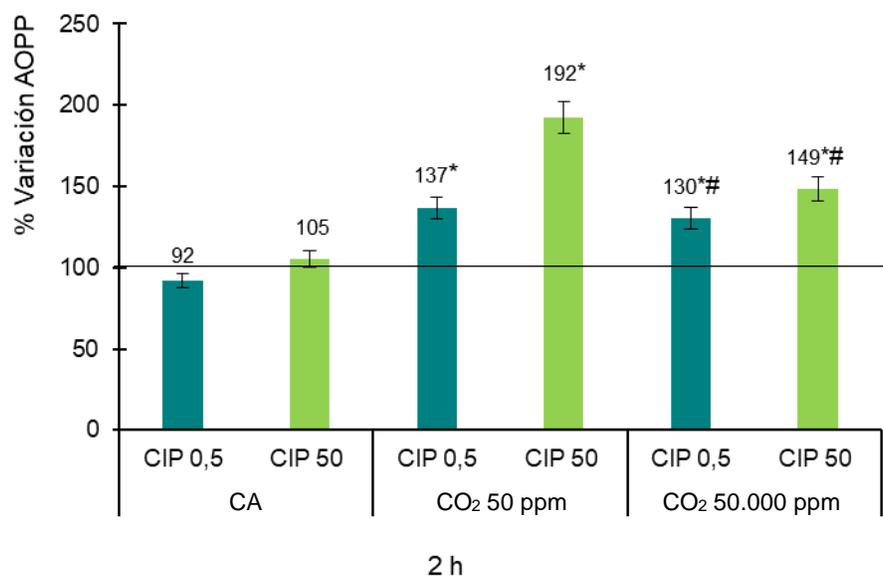


Figura 18. **Ensayo de oxidación de proteínas.** (—) representa el 100% del valor del control de cada condición, (■) CIP 0,5 µg/mL, (■) CIP 50 µg/mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las barras representan el porcentaje de variación de AOPP con respecto del control de cada condición, a las 2 h de incubación en CA y CO₂. *p<0,05 respecto de las CA. #p<0,05 respecto de cada concentración de CIP en condiciones de CO₂.

3.4.3 Determinación del potencial de membrana

Con el fin de determinar posibles cambios en la membrana de la célula bacteriana producto de las interacciones de la bacteria con CIP en CA y de CO₂, se realizaron ensayos por medio de la sonda ANS (Figura 19), esta sonda permite determinar cambios conformacionales en proteínas y estudiar membranas biológicas.

Los resultados indicaron diferencias en la alteración en la unión de ANS a la membrana de *E. coli* por parte de cada concentración CIP estudiada en CA. Se observó una disminución con respecto al control del 13% en la intensidad de fluorescencia de la sonda con CIP 0,5 µg/mL, mientras que para CIP 50 µg/mL se observó un aumento de la fluorescencia del 18% con respecto al control.

Las modificaciones del potencial de membrana en presencia de CIP y CO₂ 50 ppm fueron mayores a las observadas en CA (*p<0,05) y dependientes de la concentración de CIP. Este aumento en la fluorescencia de la sonda fue de 19 y 88% en CIP 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente en comparación con las CA(*p<0,05). En presencia de CO₂ 50.000 ppm la intensidad de fluorescencia no fue tan alta como la observada en concentraciones más bajas de CO₂. Sin embargo, presentó un aumento de 15 y 25% para CIP 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente, en relación con las CA (*p<0,05).

Estos resultados demuestran que el CO₂ genera un cambio en la acción de CIP sobre la membrana bacteriana de *E. coli*, y que estos cambios son generados por bajas concentraciones de CO₂ y altas de CIP.

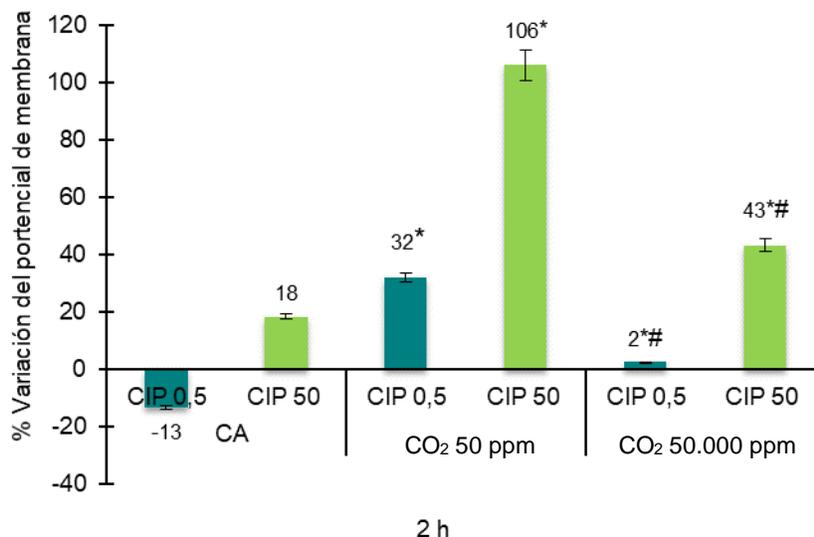


Figura 19. **Ensayo de potencial de membrana utilizando la sonda ANS.** Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las barras representan el porcentaje de variación del potencial de membrana con respecto del control de cada condición, a las 2 h de incubación en CA y CO₂. * $p < 0,05$ respecto de las CA. # $p < 0,05$ respecto de cada concentración de CIP en condiciones de CO₂.

3.4.4 Determinación del daño al ADN

La cuantificación de la 8-OHdG en el interior de la célula bacteriana es la técnica más utilizada para evaluar el daño oxidativo en la molécula de ADN^{51,113}. En la Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos en este ensayo. En CA se observó como las dos concentraciones de CIP incrementaron la formación de 8-OHdG en relación a dG respecto de la condición basal, observándose un aumento de 68 y 118% en la relación 8-OHdG/dG para CIP 0,5 y 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Comprobando que CIP en CA indujo daños en el ADN bacteriano de forma dependiente de la concentración de CIP.

El efecto CIP observado en CA se modifica en presencia de CO₂, evidenciándose un menor daño oxidativo en el ADN por parte de CIP, ya que al comparar los resultados obtenidos en la relación 8-OHdG/dG en estas condiciones, se observó como CO₂ 50 ppm generó una reducción de 91 y 49% para CIP 0,5 y 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente en comparación con las CA (* $p < 0,05$).

Para CO₂ 50.000 ppm esta reducción fue de 51 y 89% para CIP 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente en comparación con las CA (*p<0,05). Se pudo comprobar que el CO₂ no generó daño al ADN, puesto que al comparar los valores obtenidos en la relación 8-OHdG/dG por parte de los controles en condiciones de CO₂ respecto del control en CA, no se observó cambio significativo (*p>0,05). Por lo tanto, se pudo comprobar que el CO₂ modificó la capacidad de CIP para generar daño oxidativo en el ADN de *E. coli*, de una forma dependiente de la concentración de CIP en combinación con CO₂.

Tabla 2. Relación entre la cantidad de nucleósido oxidado y no oxidado en *E. coli*.

Condición	CIP µg/mL	8OH-dG/dG
CA	0	0,34 ± 0,01
	0,5	0,57 ± 0,01
	50	0,74 ± 0,03
CO₂ 50 ppm	0	0,34 ± 0,03
	0,5	0,05 ± 0,01*
	50	0,38 ± 0,02*
CO₂ 50.000 ppm	0	0,35 ± 0,01
	0,5	0,28 ± 0,00*
	50	0,08 ± 0,01*

*p<0,05 respecto de las CA

3.5 Efecto del CO₂ sobre los AXO

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaron que el CO₂ fue capaz de modificar la formación de ERO y ERN generadas por CIP con respecto a las CA, conduciendo a la disminución en el efecto bactericida ya descrito para CIP sobre *E. coli*¹²². Por lo tanto, se estudió como el CO₂ podría inferir en la activación de las defensas antioxidantes tanto enzimáticas, como no enzimáticas. Estos ensayos fueron realizados por un tiempo total de cuatro horas, esto con el fin de permitir a los AXO reaccionar contra el ataque de las ERO.

3.5.1 Sistema antioxidante enzimático

3.5.1.1 Determinación y cuantificación de la actividad SOD

En las Figuras 20 A, B y C, se muestran los resultados obtenidos en la activación de la enzima SOD intracelular (SODi), y las Figuras 20 D, E y F la activación de la SOD extracelular (SODe).

La Figura 20 A muestra los resultados obtenidos en CA de la SODi, y se pudo observar que en ausencia de CIP (control) hubo un consumo de la enzima hasta las 2 h de incubación y, a partir de este punto, se mantuvo relativamente constante en el tiempo. En presencia de CIP este efecto se invirtió; se encontró una tendencia de aumento en la activación de la enzima desde las 2 h de incubación para ambas concentraciones de CIP ($5,17 \pm 0,06$ U.SODi/mg de proteína). La cual fue semejante a un aumento en la activación de SODi de 4 veces mayor con respecto de la condición basal (* $p < 0,05$). Posteriormente a las 4 h de incubación se observó una tendencia de activación de SODi en ambas concentraciones de CIP diferente de la condición basal (* $p < 0,05$).

Un efecto similar fue observado a altas concentraciones de CO₂ (Figura 20 C) en las condiciones basales (control sin CIP). No obstante, en presencia de CIP la actividad de la enzima SODi disminuye en función del tiempo (* $p < 0,05$). En bajas

concentraciones de CO₂ (Figura 20 B) hay una reducción de la actividad enzimática hasta las 2 h de incubación en las tres variables estudiadas. Esta reducción fue muy similar en el control sin CIP (basal) y CIP 50 µg/mL. Seguidamente se observó una recuperación de la actividad de la encima a las 4 h de incubación, la cual fue significativamente diferente con respecto del control solo para CIP 0,5 µg/mL (*p<0,05).

En CA la actividad de la enzima SODe (Figura 20 D) fue diferente a la observada en SODi (Figura 20 A). En la condición basal se favoreció la activación de la SODe desde las 2 h de incubación con valores de $15 \pm 0,04$ U. /mg de proteína. En presencia de CIP ambas concentraciones promovieron un consumo de SODe a valores de $8 \pm 0,04$ U.SODe/mg de proteína. Por lo tanto, un 47% de esta enzima fue consumida para contrarrestar la formación de ERO inducidas por la acción de CIP respecto del control a las 2 h de incubación. Pasadas las 2 h de incubación se observó como el control sigue una tendencia de activación de la enzima, sin embargo, en presencia de CIP permanece constante (*p<0,05).

A altas concentraciones de CO₂ (Figura 20 F) se observó una activación de SODe ($14 \pm 0,03$ U.SODe/mg de P) a las 2 h de incubación para las condiciones basales y, en presencia de CIP, se encontró una disminución de la enzima hasta los valores de $10 \pm 0,04$ y $9 \pm 0,04$ U.SODe/mg de P, para CIP 0,5 y 50 µg/mL respectivamente (*p<0,05). Lo cual representó un consumo de 36% de la SODe por ambas concentraciones de CIP respecto del control. Posteriormente a las 4 h de incubación se observó un aumento de la actividad enzimática en todas las condiciones (*p<0,05).

Se demostró que en atmósferas de CO₂ 50 ppm (Figura 20 E) a las 2 h de incubación, solo la concentración más alta de CIP, induce un consumo de SODe ($6,29 \pm 0,00$ U.SODe/mg de P) de 18% respecto del control (*p<0,05). Sin embargo, a la 4 h de incubación se observó como CIP 0,5 µg/mL tiende activar la enzima SODe, respecto del control (*p<0,05).

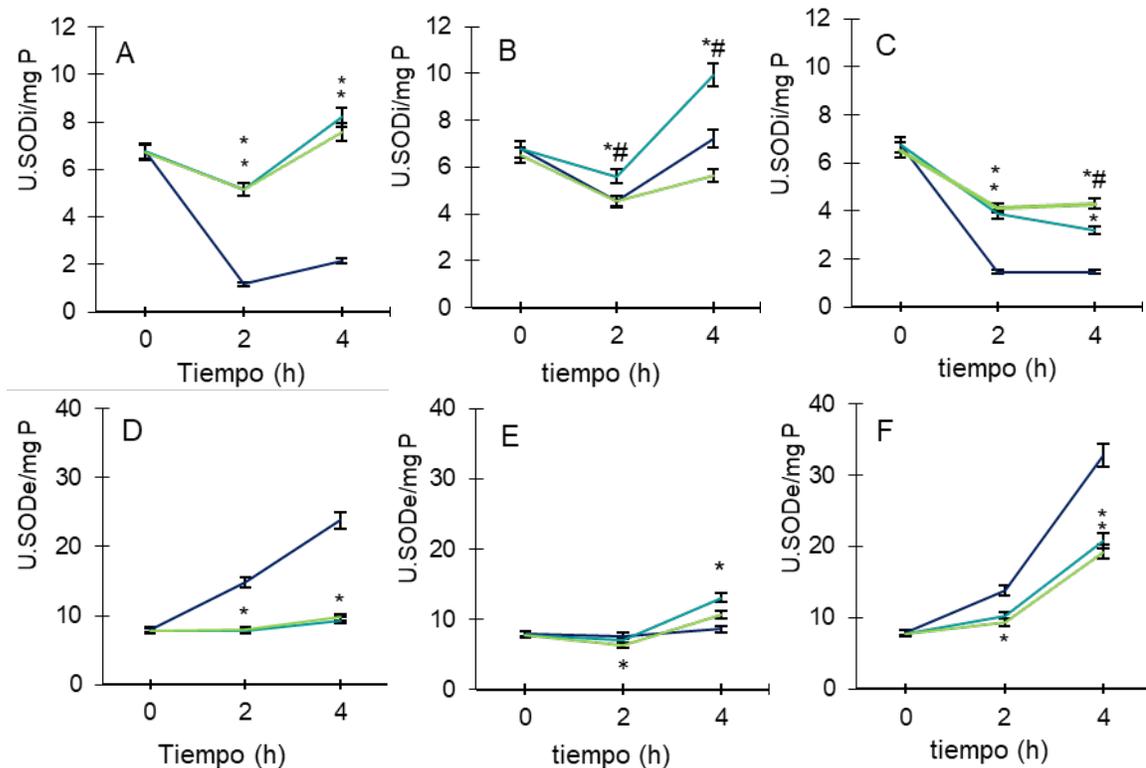


Figura 20. **Cinética de activación de SOD intra y extracelular.** (—) Control, (—) CIP 0,5 µg/mL y (—) CIP 50 µg/mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las líneas representan la media \pm DE. Las Figuras A, B y C muestran los resultados obtenidos de la SODi, en CA, CO₂ 50 ppm y CO₂ 50.000 ppm respectivamente. Las Figuras D, E y F muestran los resultados obtenidos de la SODE en CA, CO₂ 50 ppm y CO₂ 50.000 ppm respectivamente. *p<0,05 respecto del control sin CIP. #p<0,05 entre concentraciones de CIP.

3.5.1.2 Determinación y cuantificación de la actividad de CAT

En cuanto a la actividad de la enzima CAT en CA (Figura 21 A) se pudo observar una activación de la enzima con respecto al control de $1,5 \pm 0,04$ y $1,4 \pm 0,02$ U.CAT/mg de P, lo que equivale a una activación de 143 y 139% para CIP 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente a la 2 h de incubación (*p<0,05); este tiempo coincidió con el tiempo de mayor formación de ERO.

En atmósferas controladas de CO₂ la activación de la enzima fue solo para la concentración de CO₂ 50 ppm (Figura 21 B), con una activación de $1,3 \pm 0,02$

U.CAT/mg de proteína, este valor correspondió a una activación del 10% para CIP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a la 2 h de incubación, respecto de su control ($*p<0,05$). Mientras que para CO_2 50.000 ppm se observó una reducción de la actividad enzimática en todo el tiempo de ensayo (Figura 21 C). Cabe resaltar que a las 4h de incubación en todos los casos se observó una reducción gradual de la actividad enzimática, la cual fue mucho más marcada en altas concentraciones de CO_2 (Figura 21 C, $*p<0,05$).

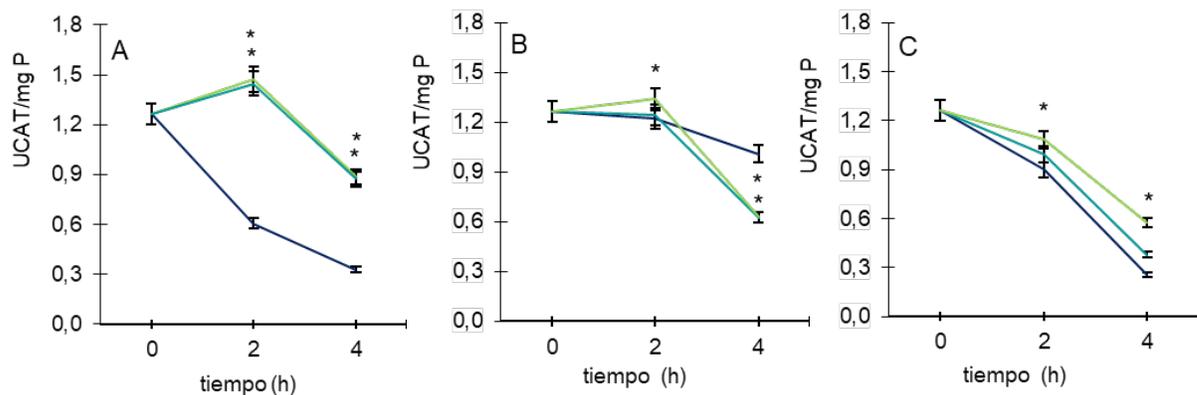


Figura 21. **Cinética de activación de CAT.** (—) Control, (—) CIP 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y (—) CIP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las líneas representan la media \pm DE. Las Figuras A, B y C muestra los resultados obtenidos en CA, CO_2 50 ppm y CO_2 50.000 ppm, respectivamente. $*p<0,05$ respecto del control. $\#p<0,05$ entre concentraciones de CIP.

3.5.2 Sistema antioxidante no enzimático

3.5.2.1 Determinación y cuantificación de GSH

La capacidad antioxidante de GSH fue diferente para todas las condiciones ensayadas. En CA (Figura 22 A), se observó un aumento significativo de GSH para CIP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al tiempo de mayor formación de ERO (2 h), respecto del control ($*p<0,05$), mientras que para la menor concentración de CIP no se observa un cambio significativo en el tiempo del ensayo.

En condiciones de CO_2 50 ppm (Figura 22 B) se vio un consumo del GSH a las 2 h de incubación ($0,13 \pm 0,00$ mM GSH/mg de proteína) en *E.coli* por la

acción de CIP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respecto del control sin CIP (* $p < 0,05$). Altas concentraciones de CO_2 (Figura 22 C) favorecieron comportamientos diferentes entre las concentraciones de CIP. Para CIP 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó un aumento de GSH ($1,95 \pm 0,04$ mM GSH/mg de proteína), respecto del control sin CIP a las 2 h de incubación (* $p < 0,05$). Mientras que para CIP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó un consumo ($0,66 \pm 0,00$ mM GSH/mg de proteína) a las 2 h respecto del control (* $p < 0,05$).

A las 4 h de incubación en CA y CO_2 50 ppm, hubo una reducción gradual de la actividad del GSH. Sin embargo, en condiciones de CO_2 50.000 ppm se observó que altas concentraciones de CIP aumentan la actividad de GSH, mientras CIP 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presento el comportamiento contrario.

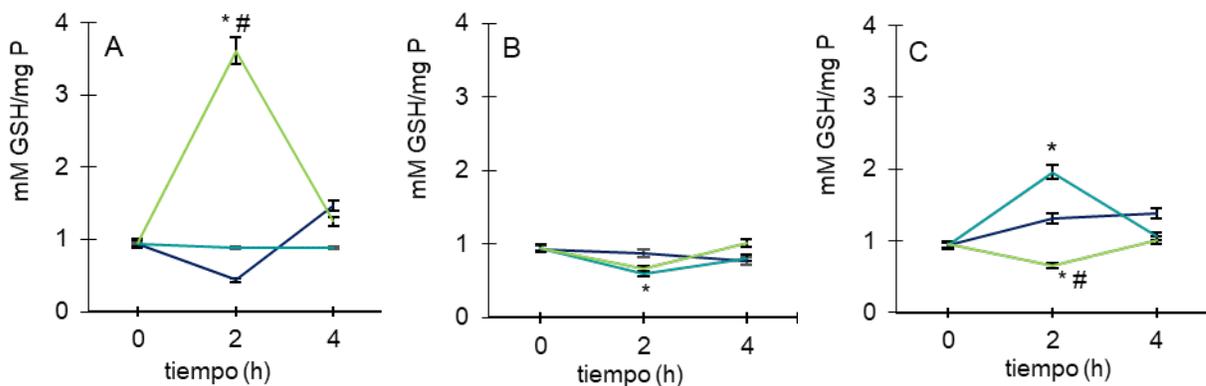


Figura 22. **Cinética de activación de GSH.** (—) Control, (—) CIP 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y (—) CIP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las líneas representan la media \pm DE. Las Figuras A, B y C muestran los resultados obtenidos en CA, CO_2 50 ppm y CO_2 50.000 ppm, respectivamente. * $p < 0,05$ respecto el control. # $p < 0,05$ entre concentraciones de CIP.

3.5.2.2 Capacidad antioxidante total FRAP

Se determinó la capacidad antioxidante total de la bacteria para evaluar cómo se contrarrestaba la formación de ERO y ERN, generadas por CIP en CA y de CO_2 . El ensayo se llevó a cabo por un tiempo total de 4 h, en el cual se observó para las CA (Figura 23 A) cómo el poder antioxidante de la bacteria fue reducido al tiempo de mayor formación de ERO (2 h) a $44,71 \pm 0,01$ y $43,01 \pm 0,00$ μM de FeSO_4/mg de proteína, estos valores representaron una reducción del 65 y 66%

con CIP 0,5 y CIP 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente en comparación con su control sin CIP (* $p < 0,05$). Seguidamente se observó una activada a la 4 h de incubación en un $64,40 \pm 0,00$ y $236,54 \pm 0,01$ μM de FeSO_4/mg de proteína, estos valores representaron una activación de 89 y 592% para CIP 0,5 y 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente en comparación con el control sin CIP (* $p < 0,05$). Esta disminución observada a las 2 h en el ensayo de FRAP ante la presencia de CIP, indicó una alteración en el equilibrio redox de la bacteria, lo cual fue consistente con el tiempo de mayor formación de ERO. Al comparar este comportamiento con las condiciones de CO_2 , se observó que los AXO de la bacteria fueron estimulados de forma muy diferente a la observada en CA (Figuras 23 B y C).

En condiciones de CO_2 50 ppm (Figura 23 B), fue posible ver al tiempo de mayor formación de ERO una activación de $42,30 \pm 0,01$ y $43,35 \pm 0,02$ μM de FeSO_4/mg de proteína, lo cual represento una activación del 18 y 21% generada por CIP 0,5 y 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente en comparación con el control sin CIP. Seguidamente a las 4 h de incubación, CIP 50 $\mu\text{g/mL}$ permanece constante, mientras CIP 0,5 $\mu\text{g/mL}$, aumentando levemente la capacidad antioxidante, estos comportamientos fueron diferentes al observado en la condición basal (* $p < 0,05$).

Los resultados obtenidos en atmósferas de CO_2 50.000 ppm (Figura 23 C) evidenciaron una respuesta del microorganismo frente a la acción de CIP, observándose un consumo de las AXO de *E. coli* en un $39,70 \pm 0,01$ y $42,51 \pm 0,01$ μM de FeSO_4/mg de proteína, por lo tanto, este consumo fue de 54 y 51% para CIP 0,5 y CIP 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente en comparación con el control sin CIP(* $p < 0,05$), al tiempo de mayor formación de ERO. Seguidamente se observó para las 4 h, una tendencia de actuación de las AXO genera por ambas concentraciones de CIP (* $p < 0,05$).

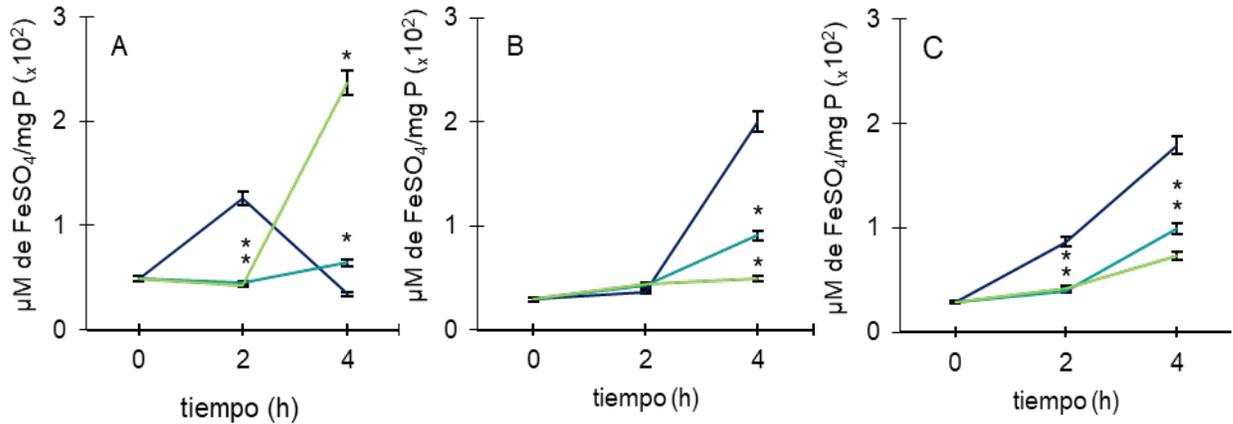
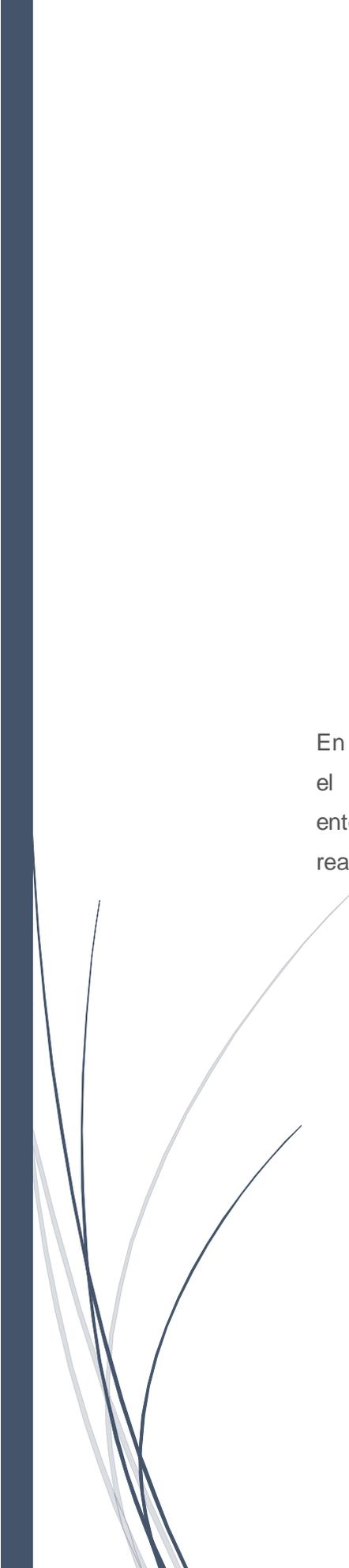


Figura 23. **Cinética de la activación de FRAP.** (—) Control, (—) CIP 0,5 $\mu\text{g/mL}$ y (—) CIP 50 $\mu\text{g/mL}$. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las líneas representan la media \pm DE ($\times 10^2$). Las Figuras A, B y C representan los resultados obtenidos en CA, CO_2 50 ppm y CO_2 50.000 ppm respectivamente. * $p < 0,05$ respecto el control.

La respuesta antioxidante de *E. coli* frente al estrés oxidativo causado por CIP se encontró afectada por la presencia de CO_2 en el tiempo de máximo estímulo de formación de ERO y ERN. Se comprobó cómo todas las defensas enzimáticas y no enzimáticas sufren cambios en su activación y posterior consumo en presencia de CO_2 .



Capítulo 4

Discusión

En este capítulo se analizan los resultados obtenidos en el capítulo anterior con el fin de contribuir al entendimiento de la participación del CO_2 atmosférico en reacciones intracelulares.

Las infecciones de tipo microbianas siguen siendo una de las principales preocupaciones para la comunidad científica debido a la propagación de microorganismo resistentes a los ATB existentes^{123,124}. Hay que tener en cuenta que las condiciones medio ambientales no son las mismas que hace 20 años. Entre los cambios más evidentes se encuentran los niveles de CO₂ atmosférico, los cuales han aumentado rápidamente, convirtiéndose en una problemática a nivel mundial. Teniendo en cuenta el papel crucial que el CO₂ tiene en reacciones intracelulares de organismos aerobios, es de esperar que este se convierta en una problemática a futuro en la cual se vea afectada la salud humana.

En el presente trabajo de tesis doctoral se estudió la influencia del CO₂ en la acción de CIP sobre el metabolismo oxidativo de *E. coli*. Los resultados obtenidos indican que el aumento de las concentraciones de CO₂ respecto de las CA reducen la actividad de CIP modificando los niveles intracelulares de ERO y, como consecuencia, producen una disminución en el daño oxidativo producido en *E. coli*.

El mecanismo de acción de CIP no solo consiste en la unión a la ADN-girasa para bloquearla, sino que también, se ha demostrado su capacidad para inducir la formación de ERO^{98,125}. Estos eventos parecen estar mediados por el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y una disminución transitoria del NADH⁴⁹. Al evaluar este mecanismo secundario de muerte celular, se comprobó que el CO₂ genera cambios en la formación de ERO inducidas por CIP. Estos resultados fueron demostrados por medio de dos técnicas diferentes (NBT y H₂-DCFDA), las cuales se complementaron para determinar las ERO.

El tiempo de mayor formación de ERO fue a las 2 h de incubación para ambas concentraciones de CIP en CA como de CO₂. Cabe destacar que el nivel de formación de ERO fue mucho menor en atmósferas controladas de CO₂ con respecto a las CA. Esta reducción fue dependiente de la concentración de CO₂ y CIP (CO₂ 50 ppm fue de 88 y 96% para CIP 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente, y

para CO₂ 50.000 ppm fue de 93 y 99% para CIP 0,5 y 50 µg/mL, respectivamente (*p<0,05)). Los resultados obtenidos en CA coinciden con antecedentes reportados en trabajos previos, donde se comprueba que el estrés oxidativo estaría involucrado no solo en la toxicidad, sino también en el mecanismo de acción de CIP frente a *Proteus mirabilis* y *S. aureus*^{108,112}. A su vez, trabajos realizados por Masadeh *et al.* han demostrado la participación de ERO como un mecanismo secundario, responsables de la citotoxicidad inducida por CIP utilizando diferentes cepas de referencia tales como *P. aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter baumannii*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Streptococcus pneumoniae*^{111,125-127}. Sin embargo, ninguno de estos estudios ha sido evaluado en atmósferas modificadas de CO₂.

Otro punto que discutir es, el aumento en la formación de ERN inducidas por CIP en atmósferas controladas de CO₂ respecto de las CA. El cual fue posible determinar mediante la cuantificación de nitritos, donde se pudo observar como el CO₂ genera un estímulo en la formación del NO de forma dependiente de la concentración de CIP y CO₂. Estas alteraciones en la formación de ERN en presencia de CO₂ y CIP podrían llegar a favorecer el comportamiento citoprotector del NO. Este comportamiento ha sido descrito por Wink y Mitchell, indicando que el NO puede neutralizar ERO y, a su vez, alterar críticamente biomoléculas como enzimas y ADN, dependiendo tanto de la concentración de NO como del organismo en estudio¹²⁸. Sumado a esta investigación, King *et al.* y Salgo *et al.* determinaron que un rango de concentraciones de NO entre 0,05 y 8 mM favorece la formación de ONOO⁻, el cual puede causar lesiones en el ADN y generar muerte celular^{129,130}.

A su vez Gusarov *et al.*, indicando que este fenómeno protector de NO puede darse a través de dos mecanismos independientes. El primero de ellos consiste en que el NO suprime temporalmente la reducción enzimática de la cisteína libre que retroalimenta positivamente la reacción de Fenton, y el segundo mecanismo consiste en la activación de CAT¹³¹. También, se ha visto que el NO incrementa la

resistencia bacteriana en un amplio rango de ATB conocidos por su capacidad de generar ERO, aumentando la capacidad de supervivencia de las bacterias¹³². Por lo tanto, es posible que la disminución observada de ERO en condiciones de CO₂ y CIP pueda deberse a una neutralización de dichas especies por parte del NO, debido a que las concentraciones de NO obtenidas en estas condiciones fueron menores a las descritas por King *et al.* y Salgo *et al.*, indicando que el CO₂ es capaz de interferir en el equilibrio entre la síntesis y el consumo de ERO y ERN disminuyendo la capacidad de CIP para generar estrés oxidativo en *E. coli*.

Al bloquear las rutas de formación de ERO y ERN, por medio de secuestrantes específicos para dichas especies como el Tirón^{133,134}, el 2,2'-dipiridil^{91,135} y el CPTIO¹³⁶, se pudo confirmar que el CO₂ es capaz de modificar las rutas de formación tanto de ERO como ERN de una forma dependiente de la concentración de CIP y de CO₂.

En CA y en presencia de CIP, la especie que más se expresó fue el O₂^{•-} a las 2 h de incubación. Esto puede deberse a que el O₂^{•-} es la primera ERO en formarse. Los resultados obtenidos con los secuestrantes CPTIO y Tirón, demostraron una baja participación de NO y O₂^{•-}, indicando que CIP en CA no induce la formación de ERN. Estos resultados coinciden con lo descrito previamente por otros autores, donde se comprobó que CIP genera estrés oxidativo en *E. coli* y *S. aureus* mediante un aumento del O₂^{•-} a tiempos cortos y dependientes de la concentración de CIP, y a su vez, este aumento de ERO disminuye los niveles de NO debido a la reacción entre estos^{118,52,110,54}. Además, Masadeh *et al.* publicó que las ERO generadas por el CIP en *E. coli* son ¹O₂ y O₂^{•-} e informaron que este efecto es inhibido por el tratamiento previo de bacterias con agentes antioxidantes como tempol, melatonina, pentoxifilina o vitaminas E y C¹¹¹.

Por otra parte, en condiciones CO₂ y en presencia de los secuestrantes anteriormente nombrados, se observó un cambio en la formación de las especies

inducidas por CIP respecto de las CA, siendo el HO• y NO las especies que más se aumentan en dichas condiciones. Estos cambios generados en la formación de ERO y ERN se pueden deber al desplazamiento del equilibrio entre las concentraciones internas y externas de CO₂, el cual favorece la formación de HCO₃⁻ y ion carbonato CO₃⁻². Estudios realizados por Ezraty *et al.* mostraron que el HCO₃⁻ y CO₃⁻² reaccionan rápidamente con HO• oxidándolo y formando CO₃⁻ cuya constante de velocidad para la formación de estas especies es de $k = 8,5 \times 10^6$ y $3,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Pero también hay que tener en cuenta que la velocidad de formación de HO• ($k = 4 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) es mucho menor que la de formación de CO₃⁻, por lo tanto, se cree que la disminución en la formación de ERO se debe al rápido consumo del HO•, que no alcanza a ser compensado por la velocidad de formación^{137,45}.

Además, la alta participación observada en condiciones de CO₂ de los radicales O₂⁻ y NO favorecería la producción de ONOO⁻ y se ha descrito que este tiene la facilidad de reaccionar con CO₂ para formar el anión nitrosoperoxocarbonato (ONOOCO₂⁻), esta reacción posee una constante de velocidad de aproximadamente de $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ¹³⁸. El ONOOCO₂⁻ posee dos vías de transformación. En un ambiente acuoso la reacción más probable es la hidrólisis, la cual produce CO₃⁻² y NO₂ con una formación del 60%¹³⁹, por lo tanto, el efecto del CO₂ sería la eliminación del ONOO⁻ previniendo la nitración y el daño oxidativo. Un efecto similar ha sido observado por Kuwahara *et al.*, demostrando que el CO₂ inhibe el efecto citotóxico de ONOO⁻ en una infección persistente en el estómago humano generada por *Helicobacter pylori*¹⁴⁰. Sin embargo, en un entorno no polar de membranas, el ONOOCO₂⁻ sufre otras reacciones que conducen en la formación de CO₃⁻ y •NO₂⁵⁸; de esta manera, la reacción con CO₂ desviaría la reactividad del ONOO⁻ hacia la formación de estos dos nuevos radicales oxidantes con químicas significativamente diferentes, dirigidos principalmente a proteínas, tiolatos y residuos aromáticos⁶⁴.

Una forma de comprender como el CO₂ modifica la formación de estrés oxidativo inducido por CIP sobre *E. coli* es evaluando la oxidación en marcadores de estrés oxidativo como lípidos, proteínas y ADN bacteriano. En este trabajo de tesis doctoral se evidencio que, en CA la mayor oxidación tanto de lípidos como de proteínas al tiempo de mayor formación de ERO (2 h), fue dada por CIP 50 µg/mL. Este daño fue asociado a la oxidación del O₂^{•-}, quien fue la especie que más aumentó en dichos tiempos a estas condiciones.

Estos resultados coinciden con los reportados por Páez *et al*, quienes analizaron las alteraciones de macromoléculas (lípidos y proteínas) como resultado de la generación de ERO en tres géneros bacterianos diferentes (*S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*), observando que a tiempos cortos (2 h) hubo una reducción de los residuos de carbonilo en *S. aureus* con CIP, mientras que en las bacterias gramnegativas, el ATB aumentó los residuos de carbonilo con respecto al control. Posteriormente las cepas sufrieron un aumento de los AOPP en presencia de CIP, siendo menor el aumento de los niveles de AOPP en la cepa de *S. aureus*, que en las otras cepas. Además, la lesión oxidativa causada por CIP generó una mayor peroxidación lipídica en *S. aureus* que en las cepas gramnegativas. Por lo tanto, describen que el daño causado por CIP fue irreversible y dio lugar a la degradación de macromoléculas como lípidos y proteínas bacterianas^{51,110}.

Al evaluar dichos marcadores de estrés oxidativo en condiciones de CO₂ y CIP sobre *E. coli*, se pudo comprobar que la disminución en el estrés oxidativo y posterior variación en la formación de especies radicalarias, repercutieron en la acción de CIP sobre estos marcadores de estrés. Se observó una mayor oxidación tanto en lípidos como en proteínas en presencia de CO₂ respecto de las CA; además de una menor oxidación en el ADN. Este aumento fue mayor para la condición de CO₂ 50 ppm y CIP 50 µg/mL, la cual produjo mayor oxidación de lípidos y menor oxidación en proteínas. Lo que confirmaría que el CO₂ induce cambios en el estrés oxidativo característico de CIP sobre *E. coli*, dependiendo de

la concentración de CIP y de CO₂, disminuyendo la formación de ERO y aumentando las ERN a tiempos cortos de incubación^{131,132}.

Estas respuestas observadas en la actividad de CIP sobre *E. coli* en atmosferas de CO₂ pueden asociarse con los resultados obtenidos por Zhao *et al.* los cuales demostraron que presiones altas de CO₂ podrían inducir la transición de *E. coli* patogénica al estado de viable pero no cultivable (VBNC, por sus siglas en inglés). Este estado consiste en una estrategia de supervivencia adoptada por muchos patógenos cuando se expone a fuertes tensiones ambientales o estrés oxidativo¹⁴¹. Colwell señaló que el estado VBNC puede representar un estado latente que mejora la supervivencia de bacterias no esporuladas en condiciones ambientales adversas¹⁴².

Respecto al análisis de la variación del potencial de membrana utilizando la sonda fluorescente ANS, los resultados indicaron que tanto en CA como de CO₂, CIP induce cambios en el potencial de la membrana bacteriana de forma dependiente de la concentración de CIP. Sin embargo, hay que aclarar que el mayor cambio en el potencial de membrana fue observado en condición de CO₂ 50 ppm y CIP 50 µg/mL. Esta variación en el potencial de superficie indica que CIP interactúa con la membrana bacteriana generando cambios por medio de la reducción del número de sitios de unión de la sonda ANS y generando un incremento en la constante de disociación de ANS. Lo cual termina afectando el transporte de electrones de la cadena respiratoria asociada a la membrana bacteriana, produciendo daños en lípidos y proteínas¹¹⁴.

La alta afinidad entre el CO₂ y la membrana plasmática fue demostrada por Spilimbergo *et al.* al encontrar que el CO₂ podría disolverse en los fosfolípidos de la membrana celular. Cuando el CO₂ se disuelve en agua, primero se disuelve en la fase líquida de las células, posteriormente se absorbe como ácido carbónico en forma no disociada. Como la capa interna de la membrana celular es hidrófila, el CO₂ gaseoso puede acumularse en la membrana celular después de haberse

difundido en ella¹⁴³. El CO₂ acumulado en la fase lipídica causará la pérdida de orden de las cadenas lipídicas, lo que aumentará la fluidez y la permeabilidad de la membrana¹⁴⁴. Debido a lo anteriormente expuesto, es probable que el aumento observado tanto en el potencial de membrana como en la oxidación de lípidos y proteínas en condiciones CO₂ y CIP fuese dado por la capacidad que tiene el CO₂ para penetrar la membrana microbiana, permitiendo una interacción directa con estas macromoléculas.

Al comprobar los daños generados por CIP en CA y de CO₂, se evaluó la capacidad de esta para generar oxidación en el ADN bacteriano. Los resultados obtenidos en la cuantificación de la 8-OHdG demostraron que CIP en CA puede generar oxidación en el ADN bacteriano de forma dependiente de la concentración; coincidiendo con lo reportado en cepas sensibles y resistentes de *S. aureus*⁵¹, como en *E. coli*¹²². A su vez Wanxin *et al.* emplearon un enfoque integrado metabonomico-proteómico para comparar las proteínas y los metabolitos expresados diferencialmente de *E. coli* en ausencia y en presencia del tratamiento con CIP. Encontrando que la replicación del ADN se inhibió con el tratamiento con CIP, lo que llevó al aumento de la expresión de las aminoacil-ARNt ligasas, pero limitó la producción de metabolitos relacionados con la biosíntesis de aminoacil-ARNt, que en última instancia causaron la disminución observada de proteínas relacionadas con la actividad metabólica¹²².

Por el contrario de las CA, CIP en presencia de CO₂ no indujo la oxidación del ADN en ninguna de las dos concentraciones estudiadas. Esto se puede deber a la modificación que el CO₂ genera en la actividad de CIP, ya que al disminuir la formación de ERO, estas no alcanzan a reaccionar con el ADN, perdiendo el segundo mecanismo de daño oxidativo característico de este ATB sobre *E. coli*.

Muchas bacterias patógenas han desarrollado mecanismos para censar la cantidad de CO₂ en su entorno que le permiten adaptarse y sobrevivir. El estudio anteriormente discutido de Zhao *et al.* en *E. coli* demuestra que el CO₂ puede

favorecer la supervivencia de la bacteria a estas nuevas condiciones¹⁴⁵. Además, se suma a esta investigación otros antecedentes reportados en diferentes microorganismos. *Bordetella*, una especie de proteobacteria gramnegativa capaz de infectar el tracto respiratorio humano¹⁴⁶, es capaz de regular la expresión del factor de virulencia en respuesta a los niveles de CO₂. Se ha encontrado que en cepas de *Bordetella bronchiseptica*, que no producían toxina adenilato ciclasa (ACT, es uno de los principales factores de virulencia de *Bordetella pertussis*) en CA; en condiciones de CO₂ 50.000 ppm si produjeron ACT además de otros factores de virulencia importantes para la colonización, la persistencia y la evasión de la respuesta inmune del hospedero¹⁴⁷.

Las anhidrasas carbónicas (AC) bacterianas de clase α y β son metaloenzimas de zinc que catalizan la hidratación reversible del CO₂, manteniendo el equilibrio intracelular de CO₂/HCO₃⁻ requerido para las reacciones biosintéticas. El análisis de la secuencia del genoma de *P. aeruginosa* PAO1, indicó que ésta posee un tipo de AC (psAC1) que le permite adaptarse y sobrevivir en condiciones de CO₂ 50.000 ppm⁴⁰. Se ha demostrado *in vivo* que el crecimiento de *E. coli*, está estrictamente correlacionada con la actividad de AC (α y β) a la concentración de CO₂ en el ambiente, las cuales son bajas. Su rápida difusión desde la célula significa que se produce espontáneamente una cantidad insuficiente de HCO₃⁻ *in vivo* para satisfacer las necesidades metabólicas y biosintéticas de la bacteria¹⁴⁸. Por lo tanto, las AC juegan un papel fundamental en la supervivencia de estas bacterias debido a su alta eficiencia para transformar niveles altos de CO₂ a HCO₃⁻. Estos resultados indicarían que los cambios observados en la acción de CIP sobre *E. coli* en atmósferas de CO₂, podrían estar estrechamente relacionados con una alta actividad de dicha enzima.

Al evaluar la respuesta antioxidante de *E. coli* frente a los diferentes tratamientos, se observó como el CO₂ ejerce cambios en la activación de los AXO. En CA se encontró una activación de casi todas las defensas antioxidantes al tiempo de máximo estímulo de ERO, exceptuando la SODe, donde se observó un

consumo enzimático. Esta activación se debe al $O_2^{\bullet-}$, el cual es rápidamente oxidado en mayor medida por SODi en un 346% y CAT en un 141% para ambas concentraciones de CIP, pero en GSH esta activación fue de 102 y 727% para CIP 0,5 y 50 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al control. Los resultados obtenidos utilizando el ensayo de FRAP confirmaron un consumo de la capacidad antioxidante total a las 2 h de incubación. Este comportamiento se asemeja a lo reportado por otros autores, donde evaluaron la capacidad de CIP para inducir la formación de ERO por medio de la activación de AXO sobre *E. coli*. Entre los antioxidantes controlados, el glutatión y el ácido ascórbico fueron quienes brindaron la mayor protección contra la acción de CIP. La participación $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 en la acción antibacteriana del ATB se analizó mediante el uso de SOD y CAT encontrando que CIP también induce una activación de estas defensas enzimáticas⁵². Este comportamiento también ha sido descrito para otros géneros bacterianos como como *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* y *S. aureus*^{99,112,118}.

En condiciones de CO_2 , la activación de los AXO fue mucho menor en SOD, CAT y FRAP respecto de lo observada en CA. Esto se puede atribuir a la disminución en la formación de ERO producto de la interacción de CIP con CO_2 , conllevando a una menor activación de las AXO para neutralizar dichas especies. Sin embargo, el GSH fue la especie más aumentada en presencia de CO_2 ; observándose una dependencia entre la concentración de CIP y de CO_2 . En CO_2 50 ppm el aumento en la formación de GSH con respecto a las CA fue de 121% para CIP 0,5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en CIP 50 $\mu\text{g/mL}$ se observó un consumo del 82% de GSH. En CO_2 50.000 ppm, ambas concentraciones de CIP indujeron un consumo de GSH con respecto a las CA de 32 y 96% para CIP 0,5 y 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Goswami *et al.* han demostrado que el GSH disminuye el efecto antibacteriano de CIP, neutralizando el estrés oxidativo asociado a dicho ATB y promoviendo la salida de este de la célula¹⁴⁹. Por lo tanto, las variaciones observadas en la actividad de CIP en presencia de CO_2 podrían deberse a la

participación activa del GSH, el cual favorecería la supervivencia de *E. coli*. El CO_2 disminuyó la capacidad de CIP para producir un desbalance oxidativo por medio de una menor formación de ERO en *E. coli*, las bajas concentraciones de ERO pudieron ser neutralizadas, bien sea por la acción del NO o por GSH, por lo que, la bacteria no activó en forma significativa las defensas antioxidantes. Los resultados obtenidos en la curva de muerte y la cuantificación del daño oxidativo al ADN indicaron que los daños generados en lípidos y proteínas podrían llegar a ser reparados permitiendo a la bacteria recuperarse y sobrevivir a la acción del ATB.

Un estudio reciente, sobre el efecto del bicarbonato de sodio como potenciador en la actividad de algunos ATB como CIP sobre *E. coli*, mostró que el HCO_3^- es intrínsecamente antibacteriano. Su mecanismo de acción es actuar como disipador selectivo del gradiente de pH transmembrana que, junto con el potencial de membrana, constituyen la fuerza protón motriz de las bacterias. También se ha demostrado que, entre muchas otras sales orgánicas, el HCO_3^- es la única capaz de producir dichos efectos, lo que refuerza el poder de este sistema tampón.

El sistema tampón de HCO_3^- es eficaz en consumir los protones en exceso, proporcionando un mecanismo eficiente para provocar un cortocircuito en el gradiente de protones transmembranal bacteriano¹⁵⁰. Por consiguiente, se favorece la desprotonación de CIP permitiendo una interacción más fuerte con el sitio activo de la ADN-girasa, produciendo un bloqueo y la función de deshacer el superenrollamiento de la doble cadena de ADN se pierde. Por lo tanto, no se genera la interacción con las enzimas encargadas de la replicación propiamente dicha y la bacteria queda incapacitada para dividirse y finalmente muere^{151,152} (Figura 25, mecanismo color rojo).

En nuestros experimentos se favoreció el mecanismo contrario, el efecto nulo observado en la curva de muerte en ambas concentraciones de CIP en presencia

de CO₂ se puede deber al gran aumento de CO₂ en el medio de incubación. El cual generaría un desbalance entre el CO₂ externo e interno, favoreciendo el aumento de protones en el medio intracelular y, como consecuencia, CIP perdería la capacidad de liberar el protón ácido del carboxilo, anulando un punto de interacción entre CIP y el ADN-girasa. Se ha demostrado que el ambiente químico proporcionado por dicho ácido en la posición 3 y el carbonilo en la posición 4 de la CIP (Figura 24), es necesario para la unión con la ADN-girasa, por lo tanto, esencial para la actividad antibacteriana (Figura 25, mecanismo color azul)¹⁵³.

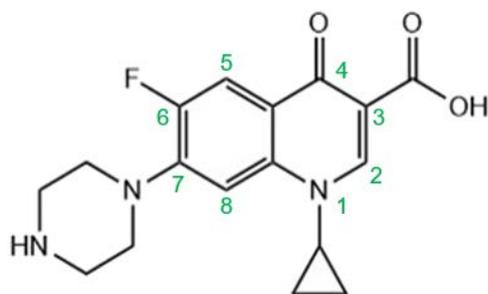


Figura 24. Estructura de la molécula de CIP. Esquema numérico que indica la posición de los grupos funcionales.

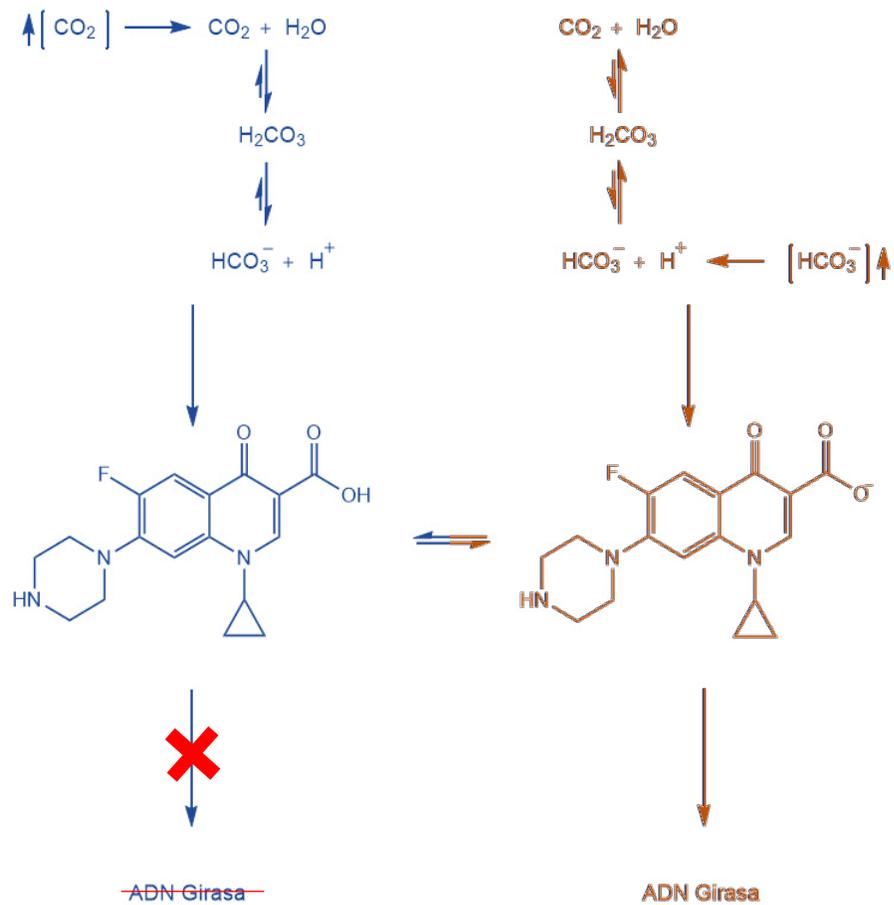
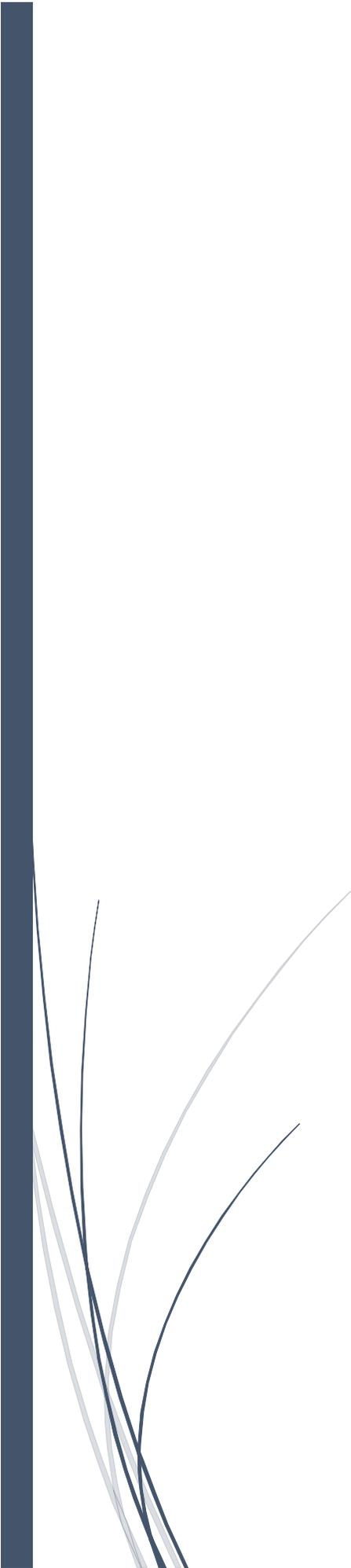


Figura 25. Modo de acción de la CIP en la ADN-girasa. Efectos de la interacción de CIP con CO₂ y HCO₃⁻.

Los resultados obtenidos indican que el CO₂ no solo modifica la capacidad de CIP para inducir estrés oxidativo sino también que podría afectar el mecanismo acción de CIP sobre la ADN-girasa, deshabilitando los dos mecanismos de acción del ATB que le permiten ejercer su efecto bactericida sobre *E. coli* favoreciendo la supervivencia del microorganismo. El cual podría en un futuro, ser causante de una infección más resistente en el hospedero.

A thick, dark blue vertical bar is positioned on the left side of the page. From the bottom of this bar, several thin, curved lines in shades of blue and grey extend upwards and outwards, creating an abstract, organic shape.

Capítulo 5

Conclusión y proyecciones

Partiendo de la hipótesis que involucra la participación del CO₂ atmosférico en reacciones intracelulares, y como éste, influencia la acción de un ATB frente a una infección bacteriana, se pudo demostrar en este trabajo de tesis doctoral que, en concentraciones de 50 y 50.000 ppm de CO₂, fue posible evidenciar modificaciones en la acción de CIP sobre *E. coli*, el cual generó un desequilibrio entre el CO₂ atmosférico y el CO₂ interno. Este desequilibrio conllevó a cambios en la respuesta oxidativa de la bacteria frente al estrés oxidativo generado por CIP en condiciones de CO₂ con respecto a las CA. Ambas concentraciones de CIP exhibieron disminución de la formación de ERO, más específicamente el HO[•]. Además, una variación en la formación de ERN que pueden llegar a actuar como defensas antioxidantes, contrarrestando las especies prooxidantes.

La participación del NO en condiciones de CO₂, requiere más estudios que permitan una mejor comprensión sobre su participación en la disminución de la actividad de CIP y ERO. A su vez, fue evidente un consumo de GSH en presencia de CO₂ a ambas concentraciones de CIP, de esta manera se altera la injuria oxidativa característica de CIP sobre *E. coli* disminuyendo su actividad.

El cambio en el desequilibrio oxidativo generado por CO₂ sobre la acción de CIP fue claramente reflejado en los marcadores de estrés. Debido a la permeabilidad que el CO₂ tuvo sobre la membrana bacteriana, fue posible evidenciar un aumento en la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas, de forma dependiente de la concentración de CIP; en ambas concentraciones de CO₂ respecto a las CA. Cabe destacar que, si bien hubo un aumento en la oxidación generada a estas macromoléculas, ésta disminuyó conforme se aumentó la concentración de CO₂ y de CIP. Indicando la pérdida de actividad del ATB aún en altas concentraciones.

Al estudiar el daño al ADN inducido por CIP en condiciones de CO₂, no se evidenció oxidación al tiempo máximo de generación de ERO, en ninguna de las dos concentraciones de CIP. Mientras que en CA fue posible observar la

oxidación del ADN, esta fue dependiente de la concentración de CIP. Por lo tanto, la oxidación observada tanto en lípidos, como en proteínas pudo llegar a ser censados y reparados por la bacteria, permitiéndole seguir con desarrollo infeccioso en el hospedero, aún frente a concentraciones supraCIM.

También hay que tener en cuenta que un aumento de ácido carbónico en el medio intracelular favorecería el aumento de protones, evitando la forma desprotonada de CIP, la cual es la responsable de la interacción entre CIP y el ADN, conduciendo a una pérdida de su acción bactericida frente a *E. coli*.

Lo anteriormente expuesto demostró que el CO₂ es un factor importante para tenerse en cuenta al momento de evaluar la actividad antibacteriana de un ATB frente a una bacteriana. Se debe considerar que las CA de CO₂ son más bajas, en comparación las concentraciones de CO₂ intracelular del cuerpo de los mamíferos. Por lo tanto, esto podría ser un factor clave para explicar la supervivencia exitosa de ciertos agentes infecciosos y la microbiota, debido a la existencia de niveles altos de CO₂ en los cuales es más probable que prosperen. Además, los efectos potenciadores de la supervivencia y la virulencia de los patógenos, así como los efectos inmunosupresores del hospedero, pueden representar nuevos objetivos terapéuticos potenciales para combatir enfermedades infecciosas.

Proyecciones

Los estudios sobre las implicancias de las emisiones de gases atmosféricos sobre organismos aerobios están cobrando importancia en la comunidad científica. Por lo que, en base a los resultados obtenidos en este trabajo es importante profundizar en el estudio del mecanismo por el cual el CO₂ modifica la acción de CIP alterando la vía de producción de ERO, ERN y la inhibición de la ADN-girasa.

Es importante estudiar la participación del NO y el CO_3^- en las modificaciones asociadas a la acción de CIP sobre *E. coli*, por medio de secuestrantes de la anhidrasa carbónica, además de los posibles genes involucrados en estas adaptaciones.

Se hace necesario evaluar la influencia del CO_2 sobre otro tipo de géneros y especies microbianas, así como de ATB bactericidas. Todo esto con la finalidad de comprender su participación e implicancias en la resistencia a antimicrobianos.

Referencias

1. Cox, P. M., Betts, R. a, Jones, C. D., Spall, S. a & Totterdell, I. J. Erratum: Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. *Nature* **408**, 184–187 (2000).
2. Solomon, S. *et al.* Persistence of climate changes due to a range of greenhouse gases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 18354–18359 (2010).
3. World Meteorological Organization (WMO). (2017). GREENHOUSE GAS BULLETIN. The State Greenhouse in the Atmosphere Based on Global Observations through 2016. (13). Recuperado de: https://library.wmo.int/doc_num.php?explnum_id=4022.
4. Butler, J H; Montzka, S. A. (2017). The NOAA annual greenhouse gas index (AGGI). Recuperado de: <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/aggi/aggi.html>.
5. Earth System Research Laboratory, Global Monitoring Division. (2017). . National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA's) annual greenhouse gas index (2016). Recuperado de: <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/aggi/>.
6. Earth System Research Laboratory, Global Monitoring Division. (2018). Trends in atmospheric carbon dioxide. Recupeado de: <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/weekly.html>.
7. World Meteorological Organization (WMO). (2018). El niño/La niña hoy, septiembre/2018. Recuperado de: http://www.wmo.int/pages/prog/wcp/wcasp/documents/WMO_ENSO_Sept18_Esp.pdf.
8. Centro Internacional para la Investigación del Fenómeno de El Niño (CIIFEN). (2018). El Niño/La Niña en América Latina; Septiembre/2018. Recuperado de: http://www.ciifen.org/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=65&Itemid=304.
9. World Meteorological Organization (WMO). (2017).El niño/La niña hoy, diciembre/2017. Recuperado de: http://www.wmo.int/pages/prog/wcp/wcasp/documents/WMO_ENSO_Dec17_Esp.pdf.
10. World Meteorological Organization (WMO). (2018). WMO statement on the status of the global climate in 2017. (1212). Recuperado de: https://library.wmo.int/doc_num.php?explnum_id=4453.
11. World Meteorological Organization (WMO), United Nations Environment Programme

- (UNEP). (2000). Summary for Policymakers: Emissions Scenarios. A Special Report of Working Group III of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Recuperado de: <http://pure.iiasa.ac.at/id/eprint/6101/2/sres-en.pdf>.
12. Climate Transparency. (2018). BROWN TO GREEN: The G20 TRANSITION TO A LOW-CARBON ECONOMY | 2018. Recuperado de: https://www.climate-transparency.org/wp-content/uploads/2018/11/BROWN-TO-GREEN_2018_Argentina.pdf.
 13. Puliafito, S. E., Allende, D. G., Castesana, P. S. & Ruggeri, M. F. High-resolution atmospheric emission inventory of the argentine energy sector. Comparison with edgar global emission database. *Heliyon* **3**, e00489 (2017).
 14. Solomon, S., Plattner, G.-K., Knutti, R. & Friedlingstein, P. Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 1704–1709 (2009).
 15. Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S. & Brooks, H. L. Regulación Respiratoria. in *Ganong, Fisiología Médica* 625–638 (2010).
 16. Cummins, E. P., Selfridge, A. C., Sporn, P. H., Sznajder, J. I. & Taylor, C. T. Carbon dioxide-sensing in organisms and its implications for human disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 831–845 (2014).
 17. Stinner, J. N., Newlon, D. L. & Heisler, N. Extracellular and intracellular carbon dioxide concentration as a function of temperature in the toad *Bufo marinus*. *J. Exp. Biol.* **195**, 345–360 (1994).
 18. Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S. & Brooks, H. L. (2010). Fisiología Respiratoria. in *Ganong, fisiología médica* 609–624.
 19. Walker, H. H. Carbon Dioxide as a Factor Affecting Lag in Bacterial Growth. *Science.* **76**, 602–604 (1932).
 20. Nattie, E. CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog. Neurobiol.* **59**, 299–331 (1999).
 21. Gutt, C. N. *et al.* Circulatory and respiratory complications of carbon dioxide insufflation. *Dig. Surgery.* **21**, 95–105 (2004).
 22. Buxton, G. V. & Elliot, A. J. Rate constant for reaction of hydroxyl radicals with bicarbonate ions. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part 27*, 241–243 (1986).
 23. Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P. & Ross, A. B. Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **17**, 513–886 (1988).

24. Stadtman, E. R. & Berlett, B. S. Fenton chemistry: Amino acid oxidation. *J. Biol. Chem.* **266**, 17201–17211 (1991).
25. Shafirovich, V., Dourandin, A., Huang, W. & Geacintov, N. E. The carbonate radical is a site-selective oxidizing agent of guanine in double-stranded oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* **276**, 24621–24626 (2001).
26. Liochev, S. I. & Fridovich, I. CO₂, not HCO₃⁻, facilitates oxidations by Cu,Zn superoxide dismutase plus H₂O₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 743–744 (2004).
27. Medinas, D. B., Cerchiaro, G., Trindade, D. F. & Augusto, O. The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. *IUBMB Life* **59**, 255–262 (2007).
28. Richardson, D. E., Regino, C. A. S., Yao, H. & Johnson, J. V. Methionine oxidation by peroxymonocarbonate, a reactive oxygen species formed from CO₂/bicarbonate and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 1538–1550 (2003).
29. Balagam, B. & Richardson, D. E. The mechanism of carbon dioxide catalysis in the hydrogen peroxide N-oxidation of amines. *Inorg. Chem.* **47**, 1173–1178 (2008).
30. Coakley, R. J., Taggart, C., Greene, C., McElvaney, N. G. & O'Neill, S. J. Ambient pCO₂ modulates intracellular pH, intracellular oxidant generation, and interleukin-8 secretion in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 603–10 (2002).
31. Abolhassani, M., Guais, A., Chaumet-Riffaud, P., Sasco, A. J. & Schwartz, L. Carbon dioxide inhalation causes pulmonary inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **296**, L657–L665 (2009).
32. Karsten, V. *et al.* *msbB* deletion confers acute sensitivity to CO₂ in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium that can be suppressed by a loss-of-function mutation in *zwf*. *BMC Microbiol.* **9**, 1–13 (2009).
33. Visca, P., Fabozzi, G., Milani, M., Bolognesi, M. & Ascenzi, P. Nitric oxide and *Mycobacterium leprae* pathogenicity. *IUBMB Life* **54**, 95–99 (2002).
34. Moser, K. M. Acute respiratory failure in obstructive lung disease. *JAMA* **225**, 705 (1973).
35. Groenewegen, K. H., Schols, A. M. W. J. & Wouters, E. F. M. Mortality and mortality-related factors after hospitalization for acute exacerbation of COPD. *Chest* **124**, 459–467 (2003).
36. Laserna, E. *et al.* Hypocapnia and hypercapnia are predictors for ICU admission and mortality in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Chest* **142**, 1193–1199 (2012).

37. Belkin, R. A. *et al.* Risk factors for death of patients with cystic fibrosis awaiting lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 659–666 (2006).
38. Paranjape, S. M. & Mogayzel, P. J. Cystic fibrosis. *Pediatr. Rev.* **35**, 194–205 (2014).
39. Ciofu, O., Hansen, C. R. & Hoiby, N. Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **19**, 251–258 (2013).
40. Lotlikar, S. R. *et al.* Three functional β -carbonic anhydrases in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Role in survival in ambient air. *Microbiol. (United Kingdom)* **159**, 1748–1759 (2013).
41. Supuran, C. T. & Capasso, C. Biomedical applications of prokaryotic carbonic anhydrases. *Expert Opin. Ther. Pat.* **0**, 13543776.2018.1497161 (2018).
42. Lushchak, V. I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **153**, 175–190 (2011).
43. Imlay, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 443–454 (2013).
44. Dixon, S. J. & Stockwell, B. R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 9–17 (2014).
45. Augusto, O. *et al.* Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 841–859 (2002).
46. Storz G , G; Zheng, M; Hengge-Aronis, R. Bacterial stress responses. in *Oxidative stress* (ed. Press, A.) Cap.4, 47. (2000).
47. Kuczyńska-Wiśnik, D. *et al.* Antibiotics promoting oxidative stress inhibit formation of *Escherichia coli* biofilm via indole signalling. *Res. Microbiol.* **161**, 847–853 (2010).
48. Mustaev, A. *et al.* Fluoroquinolone-gyrase-DNA complexes. *J. Biol. Chem.* **289**, 12300–12312 (2014).
49. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A. & Collins, J. J. A Common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* **130**, 797–810 (2007).
50. Becerra, M. C., Sarmiento, M., Páez, P. L., Argüello, G. & Albesa, I. Light effect and reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **76**, 13–18 (2004).
51. Becerra, M. C., Páez, P. L., Laróvere, L. E. & Albesa, I. Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin. *Mol. Cell. Biochem.* **285**, 29–34 (2006).

52. Goswami, M., Mangoli, S. H. & Jawali, N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 949–954 (2006).
53. Galera, I. L. D., Páez, P. L. (2012). Respuesta bacteriana al estrés oxidativo: Relación con la resistencia a antimicrobianos. *Editorial academica Española.* **64**.
54. Galera, I. L. D., Gabriela, P. M. & Páez, P. L. Relationship between oxidative and nitrosative stress induced by gentamicin and ciprofloxacin in bacteria. *J. Biol. Nat.* **5**, 122–130 (2016).
55. Fridovich, I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* **272**, 18515–18517 (1997).
56. Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527–605 (1979).
57. Fenton, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* **65**, 899–910 (1894).
58. Liochev, S. I. & Fridovich, I. The Haber-Weiss cycle - 70 years later: an alternative view. *Redox Rep.* **7**, 55–57 (2002).
59. Fridovich, I. (1975). Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. In: *Free Radicals in Biology* 1st ed. New York: William Pryor. 239–277.
60. Aurand, L. W., Boone, N. H. & Giddings, G. G. Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation. *J. Dairy Sci.* **60**, 363–369 (1977).
61. Maisch, T. *et al.* The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 7223–7228 (2007).
62. Poole, R. K. Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 176–180 (2005).
63. Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P. G. & Koppenol, W. H. Formation and properties of peroxyxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1285–1292 (1997).
64. Szabó, C., Ischiropoulos, H. & Radi, R. Peroxyxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 662–680 (2007).
65. Koppenol, W. H., Bounds, P. L., Nauser, T., Kissner, R. & Rügger, H. Peroxyxynitrous acid: Controversy and consensus surrounding an enigmatic oxidant. *Dalt. Trans.* **41**, 13779–13787 (2012).

66. Ferrer-Sueta, G. & Radi, R. Chemical biology of peroxynitrite: Kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem. Biol.* **4**, 161–177 (2009).
67. Pryor, W. a. Oxy-radicals and related species: Their formation, lifetimes, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* **48**, 657–667 (1986).
68. Avery, S. V. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem. J.* **434**, 201–210 (2011).
69. Girotti, A. W. Mechanisms of lipid peroxidation. *J. Free Radicals Biol. Med.* **1**, 87–95 (1985).
70. Siu, G. M. & Draper, H. H. Metabolism of malonaldehyde *in vivo* and *in vitro*. *Lipids* **17**, 349–355 (1982).
71. Esterbauer, H., Koller, E., Snee, R. G. & Koster, J. F. Possible involvement of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids. *Biochem. J.* **239**, 405–409 (1986).
72. Hagihara, M., Nishigaki, I., Maseki, M. & Yagi, K. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in the lipoprotein fractions of human serum. *Journals Gerontol.* **39**, 269–272 (1984).
73. Kelly, F. J. & Mudway, I. S. Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids* **25**, 375–396 (2003).
74. Bardwell, J. C. Building bridges: Disulphide bond formation in the cell. *Mol. Microbiol.* **14**, 199–205 (1994).
75. Stadtman, E. R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* **9**, 315–325 (1990).
76. Witko-Sarsat, V. *et al.* Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* **49**, 1304–1313 (1996).
77. Dedon, P. C. The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 206–219 (2008).
78. Chan, W. *et al.* Quantification of the 2-deoxyribonolactone and nucleoside 5'-aldehyde products of 2-deoxyribose oxidation in DNA and cells by isotope-dilution gas chromatography mass spectrometry: Differential effects of γ -radiation and Fe^{2+} -EDTA. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6145–6153 (2010).
79. Wei, Y. H. & Lee, H. C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med.* **227**, 671–682 (2002).
80. Halliwell, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **49**, 1341–1348 (1995).

81. Lushchak, V. I. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochem.* **66**, 476–489 (2001).
82. Fridovich, I. Superoxide radical, superoxide dismutases, and Related Matters. *J. Biol Chem* **272**, 18515-18517 (1997).
83. Carmel-Harel, O. & Storz, G. Roles of the Glutathione- and Thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 439–461 (2000).
84. Hunt, C. R. *et al.* Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res* **58**, 3986–3992 (1998).
85. Lledías, F., Rangel, P. & Hansberg, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* **273**, 10630–10637 (1998).
86. Zeller, T. & Klug, G. Thioredoxins in bacteria: Functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften* **93**, 259–266 (2006).
87. Taté, R., Cermola, M., Riccio, A., Diez-Roux, G. & Patriarca, E. J. Glutathione is required by *Rhizobium etli* for Glutamine utilization and symbiotic effectiveness. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **25**, 331–340 (2012).
88. Masip, L., Veeravalli, K. & Georgiou, G. The many faces of Glutathione in bacteria. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 753–762 (2006).
89. Sies, H., Stahl, W. & Sundquist, A. R. Antioxidant functions of vitamins E and C, Beta-carotene, and other carotenoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **669**, 7–20 (1992).
90. Taiwo, F. A. Mechanism of tiron as scavenger of superoxide ions and free electrons. *Spectroscopy* **22**, 491–498 (2008).
91. De Alencar, T. A. M. *et al.* Bipyridine (2,2'-dipyridyl) potentiates *Escherichia coli* lethality induced by nitrogen mustard mechlorethamine. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **765**, 40–47 (2014).
92. Goldstein, S., Russo, A. & Samuni, A. Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with NO[•], NO₂[•], and O₂^{•-}. *J. Biol. Chem.* **278**, 50949–50955 (2003).
93. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. & Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of Glutathione and Glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* **16**, 577–586 (2005).
94. Carreras, H., Zanobetti, A. & Koutrakis, P. Effect of daily temperature range on respiratory

- health in Argentina and its modification by impaired socio-economic conditions and PM10 exposures. *Environ. Pollut.* **206**, 175–182 (2015).
95. Martínez, S. R., Miana, G. E., Albesa, I., Mazzieri, M. R. & Becerra, M. C. Evaluation of antibacterial activity and reactive species generation of n-benzenesulfonyl derivatives of heterocycles. *Chem. Pharm. Bull.* **64**, 135–141 (2016).
 96. Páez, P. L. *et al.* Oxidative stress and antimicrobial activity of chromium(III) and ruthenium(II) complexes on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biomed Res. Int.* **2013**, 1–7 (2013).
 97. Arce Miranda, J. E., Sotomayor, C. E., Albesa, I. & Paraje, M. G. Oxidative and nitrosative stress in *Staphylococcus aureus* biofilm. *FEMS Microbiol. Lett.* **315**, 23–29 (2011).
 98. Albesa, I., Becerra, M. C., Battán, P. C. & Páez, P. L. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 605–609 (2004).
 99. Aiassa, V., Barnes, A. I. & Albesa, I. Resistance to ciprofloxacin by enhancement of antioxidant defenses in biofilm and planktonic *Proteus mirabilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 84–88 (2010).
 100. Jakubowski, W. & Bartosz, G. 2,7'-dichlorofluorescin oxidation and reactive oxygen species: What does it measure? *Cell Biol. Int.* **24**, 757–760 (2000).
 101. Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L. & Wang, Y. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic. Res.* **44**, 587–604 (2010).
 102. Quinteros, M. A., Cano Aristizábal, V., Dalmasso, P. R., Paraje, M. G. & Páez, P. L. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicol. Vitro.* **36**, 216–223 (2016).
 103. Peralta, M. A., Da Silva, M. A., Ortega, M. G., Cabrera, J. L. & Paraje, M. G. Usnic acid activity on oxidative and nitrosative stress of azole - resistant *Candida albicans* Biofilm. *Planta Med.* **83**, 326–333 (2017).
 104. Tarpey, M. M. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286**, 431R–444 (2004).
 105. Peralta, M. A., Da Silva, M. A., Ortega, M. G., Cabrera, J. L. & Paraje, M. G. Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. *Phytomedicine* **22**, 975–980 (2015).

106. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
107. Placer, Z. A., Cushman, L. L. & Johnson, B. C. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.* **16**, 359–364 (1966).
108. Aiassa, V., Barnes, A. I. & Albesa, I. Macromolecular oxidation in planktonic population and biofilms of *Proteus mirabilis* exposed to ciprofloxacin. *Cell Biochem. Biophys.* **68**, 49–54 (2014).
109. Capeillère-Blandin, C., Gausson, V., Descamps-Latscha, B. & Witko-Sarsat, V. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1689**, 91–102 (2004).
110. Páez, P. L., Becerra, M. C. & Albesa, I. Comparison of macromolecular oxidation by reactive oxygen species in three bacterial genera exposed to different antibiotics. *Cell Biochem. Biophys.* **61**, 467–472 (2011).
111. Masadeh, M., Alzoubi, K., Al-azzam, S., Khabour, O. & Al-buhairan, A. Ciprofloxacin induced antibacterial activity is attenuated by pretreatment with antioxidant agents. *Pathogens* **5**, 28 (2016).
112. Páez, P. L., Becerra, M. C. & Albesa, I. Antioxidative mechanisms protect resistant strains of *Staphylococcus aureus* against ciprofloxacin oxidative damage. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **24**, 771–776 (2010).
113. Quinteros, M. A. *et al.* Biosynthesized silver nanoparticles: Decoding their mechanism of action in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **104**, 87–93 (2018).
114. Páez, P. L., Becerra, M. C. & Albesa, I. Impact of ciprofloxacin and chloramphenicol on the lipid bilayer of *staphylococcus aureus*: Changes in membrane potential. *Biomed Res. Int.* **2013**, (2013).
115. Ravanat, J. L., Turesky, R. J., Gremaud, E., Trudel, L. J. & Stadler, R. H. Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography - mass spectrometry and HPLC electrochemical detection: Overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography - mass spectrometry assay. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 1039–1045 (1995).
116. Misra, H. P. & Fridovich, I. Superoxide dismutase: A photochemical augmentation assay. *Arch. Biochem. Biophys.* **181**, 308–312 (1977).

117. Baronetti, J. L., Villegas, N. A., Aiassa, V., Paraje, M. G. & Albesa, I. Hemolysin from *Escherichia coli* induces oxidative stress in blood. *Toxicon* **70**, 15–20 (2013).
118. Becerra, M. . & Albesa, I. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 1003–1007 (2002).
119. Sinha, A. K. Colorimetric assay of catalase. *Anal. Biochem.* **47**, 389–394 (1972).
120. Páez, P. L., Becerra, M. C. & Albesa, I. Chloramphenicol induced oxidative stress in Human neutrophils. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **103**, 349–353 (2008).
121. Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70–76 (1996).
122. Li, W. *et al.* Systematically integrated metabonomic-proteomic studies of *Escherichia coli* under ciprofloxacin stress. *J. Proteomics* **179**, 61–70 (2018).
123. Collignon, P. C., Conly, J. M., Andremont, A., McEwen, S. A. & Aidara-Kane, A. World health organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. *Clin. Infect. Dis.* **63**, 1087–1093 (2016).
124. Theuretzbacher, U. Global antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens and clinical need. *Curr. Opin. Microbiol.* **39**, 106–112 (2017).
125. Masadeh, M. M., Alzoubi, K. H., Al-Azzam, S. I. & Al-Buhairan, A. M. Possible involvement of ROS generation in vorinostat pretreatment induced enhancement of the antibacterial activity of ciprofloxacin. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* **9**, 119–124 (2017).
126. Masadeh, M. M., Mhaidat, N. M., Alzoubi, K. H., Al-Azzam, S. I. & Shaweesh, A. I. Ciprofloxacin induced antibacterial activity is reversed by vitamin E and vitamin C. *Curr. Microbiol.* **64**, 457–462 (2012).
127. Masadeh, M. M., Alzoubi, K. H. & Al-Azzam, S. I. Flouroquinolones induced antibacterial activity atteneuation by pretreatment with vitamin B12. *Int. J. Pharmacol.* **11**, 67–71 (2015).
128. Wink, D. A. & Mitchell, J. B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 434–456 (1998).
129. King, P. A. *et al.* A stable solid that generates hydroxyl radical upon dissolution in aqueous solutions: reaction with proteins and nucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 5430–5432 (1992).

130. Salgo, M. G., Stone, K., Squadrito, G. L., Battista, J. R. & Pryor, W. A. Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 1025–1030 (1995).
131. Gusarov, I. & Nudler, E. NO mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13855–13860 (2005).
132. Gusarov, I., Shatalin, K., Starodubtseva, M. & Nudler, E. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science* **325**, 1380–1384 (2009).
133. Dyachenko, V., Rueckschloss, U. & Isenberg, G. Modulation of cardiac mechanosensitive ion channels involves superoxide, nitric oxide and peroxynitrite. *Cell Calcium* **45**, 55–64 (2009).
134. Marcén, M., Ruiz, V., Serrano, M. J., Condón, S. & Mañas, P. Oxidative stress in *E. coli* cells upon exposure to heat treatments. *Int. J. Food Microbiol.* **241**, 198–205 (2017).
135. Yu, Q. *et al.* Endoplasmic reticulum derived reactive oxygen species (ROS) is involved in toxicity of cell wall stress to *Candida albicans*. *Free Radic. Biol. Med.* **99**, 572–583 (2016).
136. Keshavarz-Tohid, V., Taheri, P., Taghavi, S. M. & Tarighi, S. The role of nitric oxide in basal and induced resistance in relation with hydrogen peroxide and antioxidant enzymes. *J. Plant Physiol.* **199**, 29–38 (2016).
137. Ezraty, B., Chabaliér, M., Ducret, A., Maisonneuve, E. & Dukan, S. CO₂ exacerbates oxygen toxicity. *EMBO Rep.* **12**, 321–326 (2011).
138. Goldstein, S. & Czapski, G. Formation of peroxynitrate from the reaction of peroxynitrite with CO₂: Evidence for carbonate radical production. *J Am Chem Soc.* **120**, 3458–3463 (1998).
139. Bonini, M. G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Ferreira, A. M. D. C. & Augusto, O. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J Bio Chem.* **274**, 10802–10806 (1999).
140. Kuwahara, H., Miyamoto, Y., Akaike, T., Sawa, T. & Okamoto, S. *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite via carbon dioxide production. *Infect Immun.* **68**, 4378–4383 (2000).
141. Zhao, F., Bi, X., Hao, Y. & Liao, X. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by high pressure CO₂ and its characteristics. *PLoS One* **8**, e62388 (2013).
142. Colwell, R. R. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J Infect Chemother* **6**, 121–125 (2000).

143. Spilimbergo, S., Elvassore, N. & Bertucco, A. Microbial inactivation by high-pressure. *J. Supercrit. Fluids* **22**, 55–63 (2002).
144. Yu, T. & Chen, Y. Effects of elevated carbon dioxide on environmental microbes and its mechanisms: A review. *Sci. Total Environ.* **655**, 865–879 (2019).
145. Zhao, F. *et al.* New insights into the formation of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 induced by high-pressure CO₂. *MBio* **7**, 1–11 (2016).
146. Pittet, L. F. & Posfay-Barbe, K. M. *Bordetella holmesii*: Still emerging and elusive 20 Years on. *MicrobiolSpec* **10**, 239–254 (2015).
147. Hester, S. E., Lui, M., Nicholson, T., Nowacki, D. & Harvill, E. T. Identification of a CO₂ responsive regulon in *Bordetella*. *PLoS One* **7**, 1–12 (2012).
148. Merlin, C., Masters, M., McAteer, S. & Coulson, A. Why is carbonic anhydrase essential to *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* **185**, 6415–6424 (2003).
149. Goswami, M., Subramanian, M., Kumar, R., Jass, J. & Jawali, N. Involvement of antibiotic efflux machinery in Glutathione-mediated decreased ciprofloxacin activity in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 4369–4374 (2016).
150. Farha, M. A., French, S., Stokes, J. M. & Brown, E. D. Bicarbonate alters bacterial susceptibility to antibiotics by targeting the proton motive force. *ACS Infect. Dis.* **4**, 382–390 (2018).
151. Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J. & Zhao, X. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 385–392 (2008).
152. Aldred, K. J., Kerns, R. J. & Osheroff, N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* **53**, 1565–1574 (2014).
153. Hooper, D. C. & Rubinstein, E. (2003). Structure activity relationships of quinolones. in *Quinolone antimicrobial agents 3ed edition*. 05–08.

ANEXO
SOLUCION BUFFER Y MEDIOS DE CULTIVO

<i>Buffer salino fosfato (PBS)</i>	
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Agua destilada c.s.p	1000 mL
pH: 7,0 ± 0,2	