

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
SOL ROMINA MARTÍNEZ

“ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA GENERACIÓN
DE ESPECIES REACTIVAS Y LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DE ANTIBIÓTICOS DE USO
CLÍNICO Y DERIVADOS DE BENCENO SULFONILOS”

Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
-Año 2017-



Directora: Prof. Dra. María Cecilia Becerra

Comisión evaluadora de tesis:

Prof. Dra. Andrea Smania

Prof. Dra. Claudia Del Valle Sola

Prof. Dr. Fabricio R. Bisogno

Evaluador externo:

Prof. Dr. Andrés H. Thomas

A mi amor Andrés,
a mi hermano Ivan,
a mis viejos Patricia y Duilio

What a Wonderful World

I see trees of green, red roses too

I see them bloom for me and you

And I think to myself what a wonderful world

I see skies of blue and clouds of white

The bright blessed day, the dark sacred night

And I think to myself what a wonderful world

The colors of the rainbow so pretty in the sky

Are also on the faces of people going by

I see friends shaking hands saying how do you do

They're really saying I love you

I hear babies crying, I watch them grow

They'll learn much more than I'll never know

And I think to myself what a wonderful world

Yes, I think to myself what a wonderful world

Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecer a las instituciones que brindaron el apoyo financiero para que pueda realizar esta tesis doctoral. Las nacionales CONICET, UNC, SECyT y FONCyT; y las agencias canadienses que financiaron mis estadías en el exterior CIHR y al programa Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP).

A la Facultad de Ciencias Químicas que hace mas de 10 años que me tiene dando vueltas por sus pasillos, desde estudiante de grado hasta mi rol como docente.

Al IMBIV y departamento de Ciencias Farmacéuticas, por ser mi lugar físico de trabajo y por albergarme más horas de las que he pasado en mi casa durante estos 5 años.

A mi familia: mi vieja por acompañarme siempre pase lo que pase, por su paciencia y por ser la mejor mamá del mundo; mi viejo por enseñarme que nunca se baja los brazos y que siempre se sigue hasta el final; y a Ivan, el mejor hermano del mundo por ser mi amigo, mi mejor crítico y mi orgullo.

A Andrés por ser el mejor compañero de trabajo y de vida. Gracias mi amor por ayudarme a ser cada día la mejor versión de mí.

A mi directora Dra. Cecilia Becerra, simplemente Ceci para mí, gracias infinitas por confiar en mi y darme la oportunidad de hacer el trabajo más emocionante y gratificante que tuve en mi vida que es hacer ciencia. Gracias por siempre decir que SI a todas mis locuras y ganas de hacer cosas nuevas, además de darme un lugar con mi familia científica el 113-115.

Al Dr. Cosa por ser un científico al cual admiro y respeto profundamente, además de ser un jefe increíble que me enseñó a pensar la ciencia y verla desde otra arista (el poeta de la química). Gracias Gonzalo por haberme dejado ser parte del Cosa Group e invitarme no una vez sino dos, a pasar una de las épocas más hermosas y memorables de mi vida en el gran Montreal.

A la comisión asesora de tesis, Dres. Smania, Sola y Bisogno por acompañarme a lo largo de este camino y ayudarme a crecer científicamente con el paso del tiempo. Al Dr. Thomas por haber aceptado evaluar mi trabajo de investigación y estar presente al momento de la defensa.

A los Dres. Quevedo y Ribone, por realizar los experimentos teóricos y ayudarme a cerrar una historia dentro de mi tesis con un broche de oro.

Al Dr. Baptista por haberme brindado la oportunidad de estar en otro lab fuera de Argentina por primera vez. A todo su grupo de trabajo Cris, Tay, Isabel, Tatiana por ayudarme y hacerme sentir una más.

A las Dras. Crespo y Maldonado por su ayuda en mis primeras incursiones en el área de microscopia de fluorescencia y TEM.

A las genias de la Doc. Albesa, Mazzieri y la Ani, no solo por impartirme toneladas de conocimiento y discusiones que me hicieron pensar muchísimo y crecer, sino también por su calidez, apoyo y amor.

A Sole por ser la primera que me invito a hacer investigación y darme el espacio para conocer el mundo de la ciencia, porque sin tu confianza no estaría hoy parada acá defendiendo la tesis.

A Vir, mi mentora en la mesada en quien confió ciegamente, mi compañera de mates en el escritorio y mi amiga todos los días. Gracias porque sin vos no hubiera sido lo mismo todo este camino.

A Fontana Daniela por ser mi primera compañera docente, mi compa en San Juan no solo de docencia sino charlas infinitas, de almuerzos con alcauciles, aceitunas y vinos increíbles. Gracias Dani por todos tus consejos, por ayudarme a aprender a ser docente y por elegirme como amiga.

A Jaz y Meli por ser mis mitades en el lab, porque todas las veces que me caí estuvieron siempre para darme sus manod. A Meli por mostrarme fortaleza, valentía y amor. A Jaz por su transparencia, por nunca juzgarme y su amistad incondicional.

A Vivi la colombiana y la abejita Diame, por compartir infinidad de risas y momentos increíbles entre ensayos, correcciones, papers, charlas y momentos musicales.

Pauli, Pampi, Silvana y Mary por ser compas de lab geniales, compartir siempre su buena onda y ganas de reírnos.

A Gise y Nati por ser dos amigas de mates matutinos y uno que otro experimento.

Al grupo de farmacognosia (Juli, Pame, Lau y Jesi) por bancarme horas eternas midiendo adentro del lab siempre entre charlas y uno que otro mate.

Al grupo de tecnia (Lina, Gringa, Dani, Gaby, Caro, Carito, Ale, Meli, Lu y Carola) por haber sido casi parte de su grupo también, prestarme infinidad de veces pipetas y materiales y hasta abrirme las puertas de su lab los días feriados. Gracias chicos.

Al Cosa group por hacerme sentir una más siempre y haber compartido muchas cervezas y risas juntos. A mis amigos de otros lugares del Mundo “my Little mexican girl, Aya y Pau” que nos encontramos en Montreal.

A las secretarias del dpto. por volverlas loca con mis licencias, pero ellas siempre con una sonrisa y una palabra de aliento.

A Pussy, la primera amiga que me dio la facu y que se convirtió en mi hermana del corazón.

A las chicas (Tetu, Pera, Luchi y Can) por estar siempre y ser mis amigas de toda una vida (casi 20 años).

¡Al resto del dpto. por su buena onda!

Gracias a todos porque estoy convencida que nadie llega a ningún lugar solo!

Gracias infinitas!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

Sol

ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS Y LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE ANTIBIÓTICOS DE USO CLÍNICO Y DERIVADOS DE BENCENO SULFONILOS

ÍNDICE

Abreviaturas, acrónimos y formulas químicas	2
Resumen del trabajo de tesis	5
Introducción.....	8
1.1 Formas de vida bacterianas: células planctónicas y biofilms.....	8
1.2 La resistencia a antibióticos: una problemática mundial en aumento constante	10
1.3 Antibióticos de uso clínico y su impacto en la fisiología bacteriana	11
1.4 Antibiótico bacteriostático vs. bactericida: Linezolid y Ciprofloxacina	12
1.5 Búsqueda de nuevos compuestos con mecanismos de acción novedosos	13
1.6 Estrés oxidativo.....	15
1.6.1 Estrés oxidativo y generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN)	15
1.6.2 Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno de interés biológico.....	17
1.6.3 La química del estrés oxidativo: especies reactivas y el deterioro de macromoléculas	19
1.6.4 Sistemas de defensa antioxidantes bacterianos: enzimáticos y no enzimáticos.....	21
1.7 Antecedentes de la relación entre el estrés oxidativo y la toxicidad antimicrobiana	22
Hipótesis, objetivo general y objetivo específico.....	25
Resultados y discusión: parte I	27
1.1 Evaluación de la producción de biofilm en cepas de referencia y clínicas de <i>S. aureus</i>	27

1.1.2 Estudio de la eficiencia de erradicación de LZD en biofilm maduros de <i>S. aureus</i>	29
1.1.3 Investigación de la inducción de especies reactivas generadas en biofilms maduros de <i>S. aureus</i> por LZD.....	34
1.2 Investigación de la inducción de estrés oxidativo en cultivos planctónicos de <i>S. aureus</i>	37
1.2.1 Evaluación del perfil de actividad antibacteriana de LZD en cultivos planctónicos de cepas clínicas de <i>S. aureus</i> caracterizadas genéticamente.....	37
1.2.2 Determinación de la generación de ERO y ERN	38
1.2.3 Identificación de alteraciones producidas por ERO y ERN en la capacidad antioxidante total (FRAP), enzima superóxido dismutasa (SOD) y productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP)	41
1.2.4 Investigación de la toxicidad de LZD en células sanguíneas: Hemólisis e inducción de estrés oxidativo en Leucocitos	45
Resultados y discusión: parte II	49
2.1 Identificación del daño oxidativo inducidos por CIP en diferentes géneros bacterianos	50
2.2 Determinación de la viabilidad celular pre y post tratamiento con CIP utilizando IP como marcador	52
2.3.1 Estudio de la lesión oxidativa, en tiempo real, provocada por CIP en <i>E. coli</i>	53
2.3.2 Identificación de la lesión oxidativa provocada por el tratamiento con ciprofloxacina y PMHC en <i>E. coli</i>	62
Resultados y discusión: parte III	67
3.1 Determinación de la compatibilidad de derivados de síntesis en medios biológicos: equilibrio entre sistemas de solventes y la viabilidad bacteriana	67
3.2 Evaluación del perfil de actividad antibacteriana de BS-THQ y 4-NH₂BS-THQ.....	71
3.3 Investigación de la generación de ERO y ERN.....	72

3.4 Evaluación de la respuesta de un sistema antioxidante enzimático: Determinación cuantitativa de la actividad enzimática de SOD	77
3.5.1 Cuantificación del daño en macromoléculas.....	78
3.5.2 Análisis del daño inducido por BS-THQ y 4-NH ₂ BS-THQ por microscopia electrónica de transmisión.....	80
3.5.3 Cuantificación del daño producido por BS-THQ y 4-NH ₂ BS-THQ en membranas miméticas.....	83
3.6 Exploración de la toxicidad de las moléculas mediante predicción estructural utilizando la herramienta OSIRIS® explorer.....	85
3.7 Predicción del potencial mecanismo de acción: utilización de herramientas teóricas.....	86
Conclusiones generales.....	92
Proyecciones	94
Materiales y métodos.....	96
Bibliografía.....	115
Apéndices I y II	129

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y FÓRMULAS QUÍMICAS

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y FÓRMULAS QUÍMICASAbreviatura: significado

°C: Grados centígrados

µg: microgramos

µL: microlitros

µM: micromolar

4-NH₂BS-THQ: 4-aminobencenosulfonilo-tetrahidroquinolina

ABS: absorbancia

ADN: ácido desoxirribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

BS-THQ: bencenosulfonilo- tetrahidroquinolina

CAT: catalasa

CIM: concentración inhibitoria mínima

CIP: ciprofloxacina

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

col.: colaboradores

DIC: canal diferencial de contraste de interferencia

DMSO: dimetilsulfóxido

DO: densidad óptica

ERN: especies reactivas del nitrógeno

ERO: especies reactivas del oxígeno

h: horas

H₂B-PMHC: sonda fluorogénica

IP: yoduro de propidio

LB: Luria Bertani

LZD: linezolid

MDA: malondialdehído

MeOH: metanol

mEq: miliequivalentes

MH: Müeller Hinton

min: minutos

mL: mililitros

PBS: buffer fosfato salino

PEG: polientilenglicol

PL: peroxidación lipídica

PMHC: derivado del trolox

rpm: revoluciones por minutos

SAMR: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

SAMS: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible

SEM: microscopía electrónica de barrido

SOD: superóxido dismutasa

TEM: microscopía electrónica de transmisión

TS: tripteína soya

UFC: unidades formadoras de colonias

Fórmula química: significado

$^1\text{O}_2$: oxígeno singlete

ClO^- : anión hipoclorito

H_2O_2 : peróxido de hidrogeno

HClO : ácido hipocloroso

O_2^- : radical anión superóxido

O_2 : oxígeno molecular

OH^\cdot : radical hidroxilo

ON : óxido nítrico

ONOO^- : peroxinitrito

RESUMEN TRABAJO DE TESIS

En esta tesis doctoral se plantearon tres ejes de trabajo con la finalidad de aportar nuevos conocimientos en relación a la generación de especies reactivas nocivas asociadas a la acción de antibióticos de uso clínico y nuevos derivados de síntesis. Es fundamental la comprensión del impacto fisiológico derivado del tratamiento con sustancias antimicrobianas para la investigación de nuevos blancos terapéuticos, como también la optimización de las terapias existentes.

El primer aspecto de estudio involucró la investigación de la perturbación del estado redox en cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a metilina cuando fueron expuestas al antibiótico bacteriostático Linezolid (LZD). En este sentido, se exploraron los cambios inducidos por LZD en cepas productoras de biofilm y en cepas en estado planctónico, determinándose la acción antibiofilm de LZD. Además, se indagó si el estrés oxidativo estaba vinculado a la acción del agente bacteriostático LZD.

La segunda etapa de trabajo se focalizó en el estudio del daño oxidativo provocado por el antibiótico ciprofloxacina (CIP) con la particularidad de poder evaluar los daños y comprender el impacto fisiológico de un compuesto bactericida en tiempo real. Se estudió el fenómeno de peroxidación lipídica, uno de los eventos oxidativos más perjudiciales para las células, con una sonda fluorescente de gran sensibilidad. La intención de este análisis fue identificar en células individuales la lesión oxidativa y conocer la evolución de este proceso en el tiempo, así como poder visualizar y entender el metabolismo oxidativo desde una óptica muy cercana. Los resultados obtenidos revelaron heterogeneidad de lesiones oxidativas dentro de una población bacteriana proveniente de un mismo clon. De esta manera, se visualizó por primera vez en tiempo real y en bacterias individuales uno de los eventos oxidativos más nocivos para las células.

El tercer eje de trabajo estuvo orientado a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana. Los derivados de N-bencenosulfonilos evaluados presentaron actividad frente a cepas Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y Gram positivas, *S. aureus* metilino sensibles y resistentes. Se investigó la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y especies reactivas del nitrógeno (ERN) en las diferentes cepas, con el objetivo de evaluar el estrés oxidativo inducido como también la lesión provocada en macromoléculas bacterianas por el desequilibrio oxidativo inducido. Un estudio teórico planteando un potencial receptor, permitió identificar un potencial blanco para estos derivados. Los compuestos ensayados representan prometedoras estructuras químicas para el desarrollo de nuevas clases de antimicrobianos sintéticos.

Mediante estos estudios pudimos concluir que el estrés oxidativo no presenta un rol preponderante cuando las bacterias son expuestas a un agente bacteriostático como LZD. Por su parte, el antibiótico bactericida CIP demostró la inducción de estrés oxidativo en tiempo real y por estudios de células únicas. Además, los derivados de síntesis también revelaron un efecto de tipo bactericida con elevación de especies reactivas en diferentes géneros bacterianos. Esto conlleva a reforzar la hipótesis de que la producción de especies reactivas está asociada a la muerte celular como parte de la acción de los compuestos bactericidas.

INTRODUCCIÓN

1.1 Formas de vida bacterianas: células planctónicas y biofilms

Los ancestros de los microorganismos procariontes modernos se desarrollaron en la tierra hace unos 4.000 millones años. Sin embargo, se los consideró por primera vez, como cuerpos extraños infecciosos capaces de engendrar una enfermedad, en la enciclopedia árabe “Canon de medicina” en el año 1020 (Ober y Aloush, 1982). Finalmente, se los clasificó como microorganismos a finales de la Edad Media. En la actualidad, se estipula que sólo un 1% de los microorganismos existentes en la biosfera han sido estudiados, por lo que resta profundizar y conocer en detalle un sinnúmero de sus aspectos biológicos.

Las bacterias pueden encontrarse en la naturaleza bajo dos formas, bacterias libres denominadas planctónicas, o como comunidades organizadas y encapsuladas en una matriz que ellas mismas secretan llamadas biofilm (Figura 1).

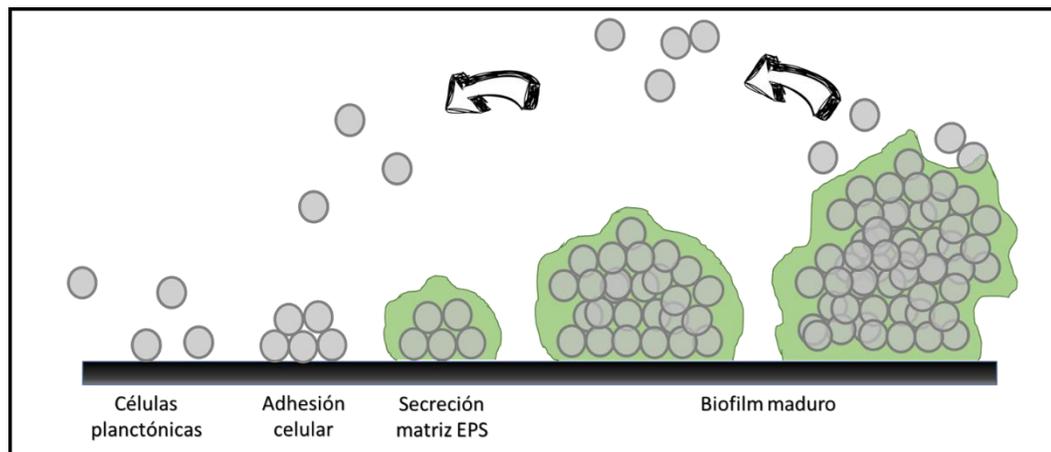


Figura 1. Células en estado planctónicas o libres y fases de formación de los biofilms

Los biofilms se presentan como comunidades tridimensionales organizadas adheridas a una superficie viva o inerte. Estos conglomerados celulares se encuentran encapsulados en una matriz polimérica extracelular (EPS) que los mismos secretan, separada por canales acuosos que actúan como el principal sistema de circulación de nutrientes y productos de desechos (Davies, 2003). Asimismo, el biofilm está compuesto en un 85% por esta matriz, mientras que el 15% restante corresponde a microorganismos (Lawrence y col., 1991). Tan sólo una pequeña fracción de las bacterias se encuentra en forma planctónica. Se ha postulado que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biofilms, y tan sólo 1% vive en estado planctónico (Donlan, 2002). La formación de biofilms representa una estrategia de supervivencia de las células procariontes. Esto se debe a que la estructura de estos conglomerados celulares les proporciona protección frente a fluctuaciones del medio ambiente (humedad, temperatura y pH), además les permite acumular nutrientes y les

facilita la eliminación de desechos. Cabe destacar que la capacidad de formar biofilms no parece restringirse a ningún grupo específico de microorganismos (Stoodley y col., 2004). A través de la combinación de técnicas de imagen tridimensional de alta resolución, estudios con marcadores fluorescentes específicos y análisis moleculares, entre otros, se ha demostrado que los biofilms no son simplemente células pasivas adheridas a superficies, sino sistemas estructuralmente dinámicos y complejos (Davey y O'Toole, 2000).

Hace ya algunos años se ha tornado relevante, no sólo el estudio de los microorganismos como poblaciones, sino la comprensión del comportamiento de las células individuales (Hesper Rego y col., 2017). Sin embargo, desde 1940 se reconoce que, dentro de una población bacteriana, las células individuales no son fenotípicamente homogéneas, incluso cuando provienen genéticamente de un mismo clon. Recientemente, los estudios han demostrado que pueden existir múltiples subpoblaciones fenotípicamente distintas dentro de una población bacteriana. Estas subpoblaciones varían en su estado fisiológico, tamaño, frecuencia, y el grado de susceptibilidad a un fármaco (Kester y Fortune, 2013). En este contexto, las bacterias pueden clasificarse como susceptibles, resistentes o tolerantes a un determinado antibiótico. Es así que se definen:

- i) Resistentes: hace referencia a que las células continúan replicándose inclusive a una dada concentración de fármaco. Generalmente, la resistencia se produce por mecanismos de bloqueo del sitio blanco y puede generarse por mutaciones genéticas específicas, inactivación enzimática de la droga o modificación de enzimas necesarias para activar una prodroga, además de mecanismos que previenen que la droga alcance el sitio específico de interacción (bombas de eflujo y reducción de la permeabilidad a la droga) (Keren y col., 2004).
- ii) Tolerantes: se utiliza para indicar que una bacteria sobrevive, pero no se duplica a una dada concentración de fármaco. Por lo tanto, la tolerancia a los fármacos es un descriptor relevante de la respuesta bacteriana frente a los antibióticos bactericidas. Los mecanismos fenotípicos de tolerancia incluyen bacterias que presentan un estado de latencia o durmiente, aquellas con crecimiento asimétrico y células de tipo persistentes (Schmidt Grant y col., 2012).
- iii) Susceptibles: se aplica cuando una dada concentración de un fármaco inhibe el crecimiento y desarrollo de una cepa bacteriana, y así se asocia el efecto con una alta probabilidad de éxito terapéutico (Rodloff y col., 2008).

Las poblaciones bacterianas producen células persistentes, las cuales son en gran parte responsables de los altos niveles de tolerancia del biofilm a los antimicrobianos, pero prácticamente poco se conoce acerca de su biología (Keren y col., 2004). Por lo tanto, es de vital relevancia el entendimiento del

comportamiento de células individuales, dado que células idénticas pueden manifestarse de diferente forma. La base de este conocimiento pretende entender en detalle cómo actúan las poblaciones bacterianas en respuesta a un tratamiento anti-infeccioso; además de aportar herramientas claves en el diseño de terapias combinadas para hacer frente desde múltiples aristas a una infección, como también abordar diferentes aspectos de la fisiología celular. Resulta apremiante la mayor comprensión de la resistencia fenotípica y los mecanismos de tolerancia, como así también el estrés generado por antibióticos y otros factores que pueden inducir tales adaptaciones fenotípicas (Kester y Fortune, 2013).

1.2 La resistencia a antibióticos: una problemática mundial en aumento constante

La resistencia bacteriana a antibióticos es un problema grave que enfrenta la salud pública mundial. Está causada por la capacidad de adaptación que desarrollan los microorganismos a ambientes hostiles y el uso clínico inadecuado de los antimicrobianos. La última asamblea de la Organización Mundial de la Salud (OMS), celebrada en Ginebra el 12 en mayo de 2015, acordó, entre los países miembros, un plan de acción global para combatir la resistencia a los antibióticos. Actualmente, se registran 700.000 muertes anuales asociadas a resistencia a antimicrobianos con una proyección en aumento de 10.000.000 de muertes para el año 2050 (Figura 2), superando al cáncer como causa principal (Cox y col., 2017). En la actualidad existe un aumento creciente en la prevalencia de *Staphylococcus* resistentes a meticilina y patógenos Gram negativos multiresistentes como son Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*.

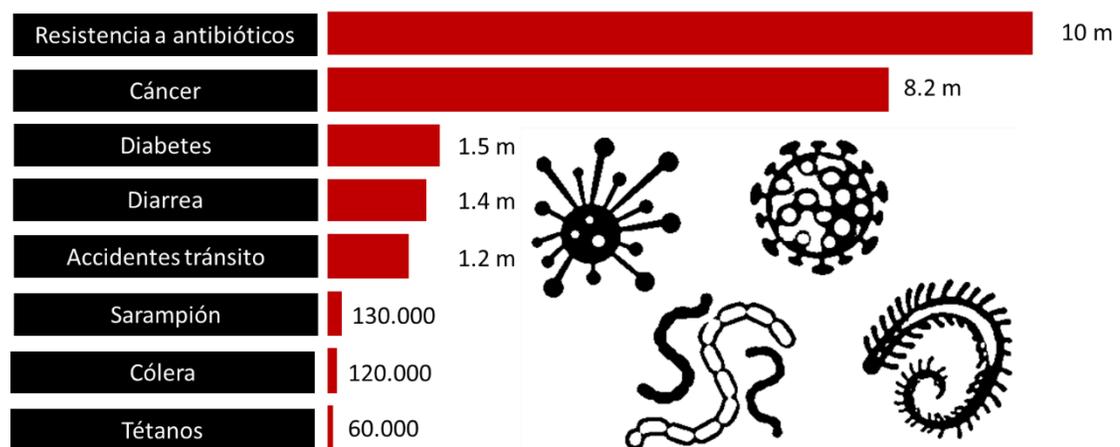


Figura 2. Proyección de causas de muerte para el año 2050, ascendiendo la resistencia a antibióticos a 10 millones por año (McCarthy, 2016).

Por su parte, el patógeno *S. aureus* resistente a meticilina (SAMR) adquirido durante la hospitalización, se encuentra dentro de los de mayor relevancia clínica a nivel mundial con un continuo aumento de estas cepas en la comunidad. Datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) revelan que pacientes infectados con SAMR tienen una probabilidad de mortalidad superior al 64%, en contraste con aquellos pacientes infectados por cepas sensibles a meticilina (WHO reports, 2014). Actualmente, más del 80% de las infecciones bacterianas informadas están asociadas a la producción de biofilms. Además, la EPS secretada por los biofilms juega un rol muy eficiente en reducir la interacción física entre los microorganismos y los antibióticos, limitando la cantidad de antimicrobiano disponible y en consecuencia incrementando el número de fallas en los tratamientos. Por este motivo se buscan estrategias para prevenir su formación debido a que inducen una rápida resistencia a los antibióticos (Stewart y Costerton, 2001; Patel, 2005).

1.3 Antibióticos de uso clínico y su impacto en la fisiología bacteriana

La resistencia a antibióticos adquirida por diferentes patógenos ha llevado a la necesidad de comprender en profundidad los mecanismos por los cuales estos agentes ejercen su efecto, así como también el impacto que producen en el metabolismo celular bacteriano. Previamente, se han descrito los sitios de acción primarios o *targets* de los antibióticos de uso clínico aprobado. Sin embargo, los efectos secundarios derivados de la interacción del antibiótico con el sitio primario de acción como la generación de especies reactivas son objeto constante de estudio.

La clasificación entre antibióticos bactericidas y bacteriostáticos surge de un test *in vitro*, el cual no arroja información sobre los cambios fisiológicos provocados en las células. Por lo tanto, se define como bacteriostático a aquel antibiótico que inhibe el crecimiento celular, mientras que bactericida al que induce muerte celular (Pankey y Sabath, 2004).

Numerosos estudios han demostrado que la muerte celular mediada por antibióticos es un proceso complejo que no puede ser descrito en su totalidad por la interacción específica antibiótico-target. Esta unión trae aparejada una serie de cambios en el estado metabólico de la célula que desempeñan un papel protagónico en la modulación de la susceptibilidad a los antibióticos (Becerra y Albesa, 2006; Wang y col., 2009; Dwyer y col., 2012, 2014, 2015; Belenky y col., 2015; Zhao y col., 2015). Los antibióticos bactericidas derivados de fluorquinolonas, aminoglucósidos, entre otros, demostraron producir cambios celulares que inducen la producción de especies reactivas tóxicas. Recientemente, se ha relacionado la eficacia de los antimicrobianos al estado metabólico de la célula (Lobritz y col., 2015) y se ha señalado a la perturbación de la respiración celular como un subproceso de gran relevancia posterior a la interacción antibiótico-target. Por otro lado, la mayoría de los

antibióticos bactericidas producen inestabilidad metabólica y formación de especies reactivas tóxicas derivadas del oxígeno y nitrógeno que podrían mediar la muerte celular (Becerra y col., 2002; Becerra y col., 2004; Dywer y col., 2007; Kohanski y col., 2007; Fotti y col., 2012; Dywer y col., 2014). Además, los daños provocados por estas especies reactivas del oxígeno (ERO) han sido estudiados y definidos como biomarcadores de estrés, así como también la activación de sistemas de defensa frente a un desequilibrio del estado redox celular (Becerra y col., 2006; Páez y col., 2011; Aiassa y col., 2012; Rowan y col., 2016). Sin embargo, han sido propósito de estudio mayoritariamente en antibióticos bactericidas.

1.4 Antibiótico bacteriostático vs. bactericida: Linezolid y Ciprofloxacina

El antibiótico bacteriostático LZD (Figura 3A) es utilizado para el tratamiento de bacterias Gram positivas resistentes a otros fármacos (Livermore, 2003). Ésta oxazolidinona LZD es una de las alternativas terapéuticas para el tratamiento de SAMR, y fue lanzado al mercado en el año 2001, siendo uno de los últimos antibióticos aprobados por la FDA (Zurenko y col., 2001). Tedizolid ha sido aprobado recientemente (año 2014) para su comercialización y algunos de sus análogos están siendo evaluados mediante ensayos clínicos (Laxminarayan y col., 2013). El mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis proteica, interviniendo en la formación del complejo de iniciación ribosoma-fMet-tRNA por unión a la subunidad ribosomal 50S (Swaney y col., 1998; Livermore, 2003). Mendes y col. (2014) reportaron un estudio, en Estados Unidos, durante el periodo 2004 hasta 2014, con 2980 aislamientos clínicos de los cuales 1537 eran susceptibles a meticilina mientras que 1443 presentaron resistencia. Sin embargo, el 99,8% de las cepas fueron susceptibles a LZD (CIM: 2 µg/mL), excepto 3 de ellas que exhibieron valores de CIM entre 4 y 32 µg/mL, siendo sólo el 0,2% resistentes al antibiótico. Durante el mismo periodo, otro programa de vigilancia se realizó con 25.000 aislamientos y el porcentaje de cepas resistentes a LZD fue de 0,1%.

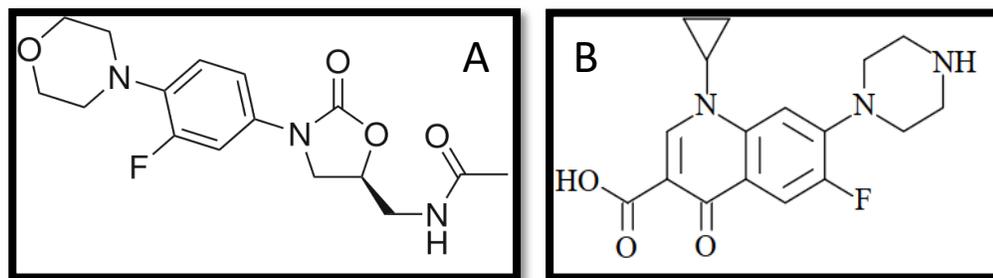


Figura 3. Estructura química del antibiótico bacteriostático LZD (A) y del compuesto bactericida CIP (B).

Recientemente, Wang y col. (2014, 2015) describieron los efectos adversos derivados del tratamiento con LZD en células sanguíneas. De esta manera, vincularon la estrecha relación que existe entre el estrés oxidativo generado y la toxicidad hematológica. Sin embargo, al momento, no se ha descrito la inducción de estrés oxidativo por parte de LZD en bacterias.

La quinolona CIP (Figura 3B) es un antibiótico de tipo bactericida de amplio espectro, el mecanismo de acción es por bloqueo de la actividad de la subunidad A del ADN girasa bacteriana (topoisomerasa II y topoisomerasa IV). Estas enzimas, topoisomerasa II y IV, son esenciales para la vida bacteriana ya que se encargan de la transcripción, replicación, reparación y almacenamiento del ADN. Ciprofloxacina interfiere en la replicación del ADN al bloquear o inhibir las enzimas topoisomerasa II y topoisomerasa IV, enzimas esenciales para mantener la conformación y topología del ADN. La enzima ADN girasa es un tipo de topoisomerasa II, y es el sitio blanco específico en el caso de bacterias Gram negativas. Por su parte, la topoisomerasa IV es el sitio de bloqueo en bacterias Gram positivas. Además, al momento se han detectado un grupo de especies bacterianas en las cuales el mecanismo de acción es la inhibición de ambas enzimas.

Trabajos previos en diferentes géneros bacterianos han demostrado la inducción de estrés oxidativo por parte de la familia de las quinolonas (Becerra y col., 2006; Kohanski y col., 2007; Wang y col., 2009; Belenky y col., 2015).

1.5 Búsqueda de nuevos compuestos con mecanismos de acción novedosos

Entre las principales propuestas para enfrentar la problemática de la resistencia a antibióticos, se destaca la necesidad del descubrimiento de nuevas moléculas activas, con mecanismos de acción novedosos, es decir, diferentes a los descritos hasta el momento (Rogers y col., 2012; Wenzel y col., 2013; Bassetti y col., 2015). Actualmente, existen estrategias de diseño y síntesis de compuestos con actividad biológica, basados en la relación entre la estructura molecular y los efectos que dichas moléculas provocan en los sistemas biológicos. Estas estrategias se fundamentan en reducir las etapas del descubrimiento de fármacos y desarrollo de medicamentos que representan un proceso largo y complejo (entre 8 y 12 años) y requieren, además, una gran inversión en recursos humanos y materiales con resultados impredecibles. Según datos provistos por las principales empresas farmacéuticas multinacionales, se necesitan entre 300 y 900 millones de dólares para introducir un nuevo medicamento para su comercialización. Cada nuevo fármaco es fruto de un intensivo proceso de búsqueda, durante el cual se examinan todas las posibilidades para desarrollar el medicamento más eficaz, seguro y de calidad (Miana GE, 2015).

La disciplina científica que se ocupa del diseño y desarrollo de nuevas moléculas activas es la Química Medicinal, la cual por definición oficial de la IUPAC es

la ciencia que se ocupa del descubrimiento, desarrollo e identificación de fármacos. Para ello, cuenta con una metodología propia, que comienza con el descubrimiento de compuestos líderes o prototipos y utiliza para su optimización los estudios de relaciones estructura/ actividad biológica (REA). Para esto, debe tenerse en cuenta dos aspectos principales de estudio, uno químico, vinculado con la fisicoquímica, la espectroscopía orgánica, la química computacional, entre otras disciplinas y otro netamente biológico. Este último suma el aporte de diversas disciplinas: Enzimología, Bioquímica, Microbiología, Biotecnología, entre otras (Wermuth, 2008).

El proceso de desarrollo de nuevos fármacos (principio activo) consta de varias etapas, comienza con la búsqueda y optimización del prototipo¹, fase que incluye la síntesis, el aislamiento, los ensayos biológicos y los estudios de REA, entre otros. Luego de la obtención de el/los candidato/s se continúa con una fase de desarrollo, la cual incluye las fases preclínicas y clínicas que va a culminar en el registro y autorización del medicamento para su posterior comercialización.

La quimioteca diseñada y sintetizada por el grupo de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC dirigido por la Prof. Dra. María Rosa Mazzieri, cuenta con más de 140 derivados de síntesis. La estrategia seleccionada para el diseño racional se basó en la combinación de fragmentos de estructuras con alguna actividad biológica *per se* (Congreve y col., 2008). Para tal fin, se seleccionaron heterociclos (Het) unidos a un grupo bencenosulfonilo (BS) a través de un átomo de nitrógeno. Los fragmentos químicos, BS y Het (Figura 4), presentan individualmente diversas propiedades biológicas como: antimaláricas (Gupta y col., 2008), anticancerígenas (Liou y col., 2008), receptores de glucocorticoides no esteroideos (Roach y col., 2008), receptores de agonistas β -adrenérgicos (Shakya y col., 2009), antagonistas de receptores histaminérgicos H3 (Jesudason y col., 2006), entre otras.

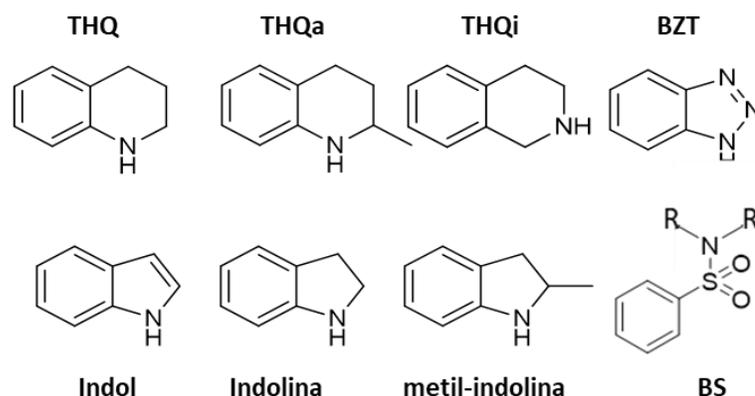


Figura 4. Estructuras Bencenosulfonilo (BS) y fracciones heterocíclicas (Het). Las fracciones heterocíclicas: Tetrahydroquinolina (THQ), Tetrahydroquinaldina (THQa), Tetrahydroisoquinolina (THQi), Benzotriazol (BZT), Indol, Indolina, metil-indolina.

¹ Prototipo (líder): es un compuesto de estructura química conocida que presenta alguna actividad biológica. Este prototipo puede presentar desventajas que pueden superarse durante la manipulación química de su estructura molecular

Previamente, se ha demostrado que los compuestos N-bencenosulfonil-benzotriazol (BS-BZT) y su análogo N-4-acetamidobencenosulfonilo-benzotriazol (AcNHBS-BZT) presentan actividad antibacteriana frente a cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213. Se observó que BS-BZT indujo la producción de ERO lo que conlleva a una alteración en el metabolismo bacteriano (Hergert y col., 2008).

1.6 Estrés oxidativo

1.6.1 Estrés oxidativo y generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN)

El oxígeno molecular es una molécula central en la respiración celular de las especies aerobias. Sin embargo, ciertos derivados del oxígeno son altamente tóxicos para las células. En la década de 1950, Gerschman y colaboradores propusieron que los radicales libres que contenían oxígeno eran responsables de los efectos tóxicos en organismos aerobios (Gerschman y col., 1954). Años después, Fridovich (1978) introdujo el término estrés oxidativo, un concepto ampliamente utilizado en los sistemas redox biológicos y en medicina. El concepto ilustrado en la Figura 5 describe un desequilibrio debido al incremento de factores prooxidantes por encima de los antioxidantes en un sistema determinado (Sies, 2015).

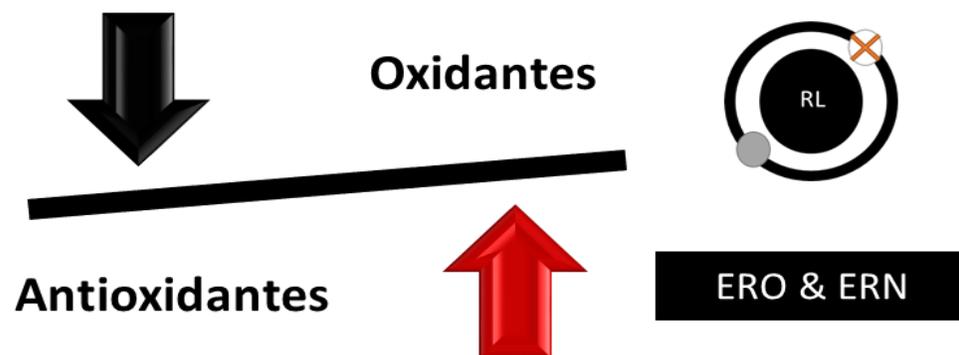


Figura 5. Representación del desequilibrio producido por la generación de estrés oxidativo en un sistema determinado y las especies derivadas del desbalance: especies reactivas del oxígeno (ERO) y especies reactivas del nitrógeno (ERN).

Las especies que producen este desbalance se denominan especies reactivas del oxígeno (ERO), intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) y especies reactivas del nitrógeno (ERN), los cuales son radicales libres *per se* o moléculas que reaccionan y producen fácilmente radicales libres. Los radicales libres son inestables y altamente

reactivos debido a que presentan en su estructura electrónica un electrón desapareado, los cuales reaccionan con diversas estructuras susceptibles de la célula como proteínas, lípidos y ADN. Las reacciones donde intervienen radicales libres son en cadena y se propagan hasta que dos radicales reaccionan y forman una molécula de capa cerrada (todos los electrones apareados). Sin embargo, la constante de velocidad de la finalización de la reacción radicalaria (dos radicales) es mayor que la que da lugar a la interacción entre los radicales libres y diferentes componentes celulares. De esta manera, la célula mantiene una concentración de radicales baja en el estado estacionario o basal (Lichtenberg y Pinchuk, 2015; Storz, 2016).

Las ERO pueden ser radicales libres y especies no radicalarias; de acuerdo con algunas definiciones, la clasificación de ERO e IRO describe las especies químicas formadas por la reducción incompleta del oxígeno molecular. Éstas son: el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Además, se incluyen dentro de este grupo, ácidos, tales como el hipocloroso ($HOCl$), hipobromoso ($HOBr$) e hipoiodoso (HOI); así como también, se incorporan los radicales peroxilo (ROO^{\cdot}), alcoxilo (RO^{\cdot}), semiquinona ($SQ^{\cdot-}$), carbonato ($CO_3^{\cdot-}$) e hidroperóxidos orgánicos ($ROOH$), mientras que el oxígeno singlete (1O_2) es una especie excitada del O_2 . Por su parte, las ERN incluyen al óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO_2), nitrito (NO_2^-) y peroxinitrito ($ONOO^-$), siendo todas estas especies responsables del daño oxidativo (Halliwell, 2006; Winterbourn, 2008; Nathan y Ding, 2010). La Figura 6 ilustra en forma esquemática la producción de las principales ERO y ERN.

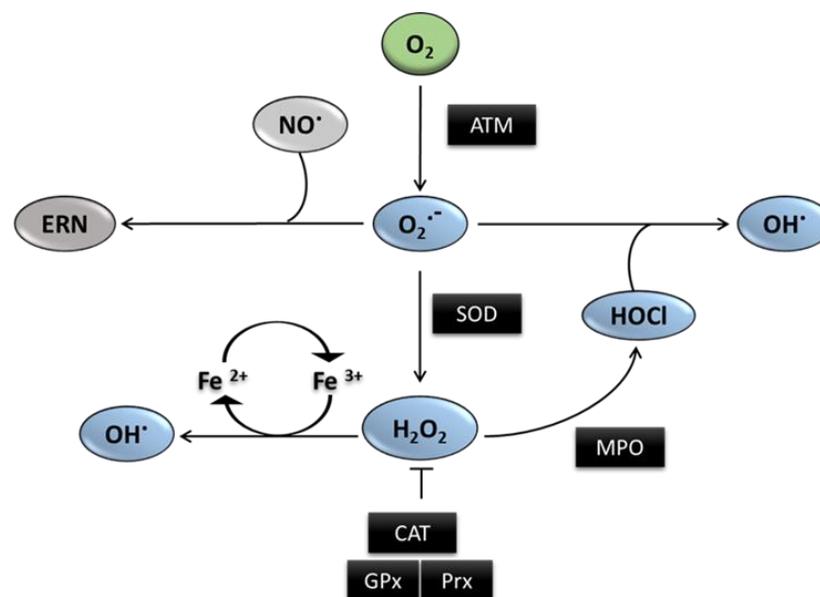


Figura 6. Esquema de la generación de ERO y ERN. Abreviaturas de la figura: antimicrobianos (ATM), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), mieloperoxidasa (MPO), glutatión peroxidasa (GPx) y peroxidasa (Prx).

Para detectar estas formas de estrés oxidativo se pueden cuantificar directamente las ERO y/o ERN, o bien, determinar diferentes productos generados por reacción de estas especies reactivas con macromoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), y también evaluar el comportamiento de los sistemas de defensas antioxidantes.

1.6.2 Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno de interés biológico

Oxígeno molecular (O_2): no es un radical libre, pero es considerado una especie dotada de una gran reactividad química, dado que se reduce en condiciones aerobias en forma incompleta y genera especies altamente nocivas (Pisoschi y Pop, 2015);

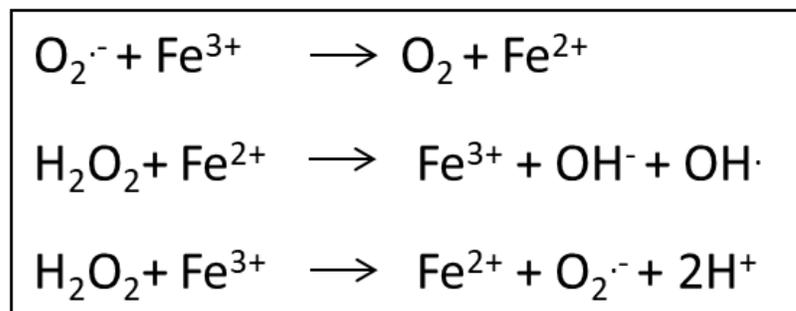
Oxígeno singlete (1O_2): es una especie excitada del oxígeno molecular, presenta una vida media de alrededor de 2 μs en agua, pero puede variar de acuerdo con el medio en el que se encuentre. Reacciona rápida y selectivamente con biomoléculas insaturadas (ácidos grasos poliinsaturados o guaninas del ADN), conduciendo a peróxidos e hidroperóxidos. Se genera durante la reacción del H_2O_2 u otros peróxidos como peroxinitritos (Di Mascio y col., 1994), con radical anión superóxido (Khan y Kasha, 1994) o con hipoclorito.

Radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$): La primera reducción del oxígeno produce esta especie, la cual tiene una baja reactividad con la mayoría de las biomoléculas y es un oxidante débil a pH neutro. El radical anión superóxido dismuta produciendo oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. A su vez, puede ser transformado a H_2O_2 por enzimas pertenecientes a la familia de superóxido dismutasa (SOD) que catalizan la conversión de superóxido por la acción de factores extracelulares o provenientes del metabolismo del oxígeno (Baptista y col., 2016). Debido a su característica de anión, no atraviesa membranas biológicas y por este motivo no induce peroxidación lipídica en los constituyentes celulares lipofílicos, pero puede causar la reducción de metales de transición tales como el Fe^{3+} . La reducción es mediada por enzimas tales como NADPH oxidasa, xantina oxidasa, o por constituyentes de la cadena respiratoria. La eliminación rápida de $O_2^{\cdot-}$ en las células es importante porque esta especie da origen a otras altamente reactivas tales como H_2O_2 y OH^{\cdot} , así como también media la formación de peroxinitritos al reaccionar con el óxido nítrico (ON) (Halliwell y Gutteridge, 1986).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): puede ser generado por cualquier sistema que produzca radical anión superóxido, ya que éste dismuta fácilmente. La presencia de oxidasas (urato oxidasa, glucosa oxidasa, D-aminoácido oxidasa) puede resultar en la síntesis directa de H_2O_2 por la transferencia de dos electrones al oxígeno molecular. El H_2O_2 es capaz de producir radicales extremadamente reactivos como resultado de su

interacción con iones metálicos (Gutteridge, 1994). Por acción directa puede: i) reaccionar con proteínas que contengan hierro y liberar este metal, ii) oxidar ADN, lípidos, grupos sulfhidrilos (-SH), y los ceto-ácidos (Kohen y Nyska, 2002). A su vez, el H_2O_2 puede ser transformado a H_2O por la acción de la enzima catalasa.

Radical Hidroxilo (OH^\bullet): es un radical muy agresivo, responsable del daño oxidativo producido en la mayoría de las biomoléculas. El radical hidroxilo puede ser el producto de la reacción de Fenton (Esquema 1) y también originarse por radiaciones de alta energía en el agua o por radiación del H_2O_2 con luz ultravioleta (Stahl y Sies, 1997). Para que la reacción de Fenton se produzca, el Fe^{3+} debe ser continuamente reducido a su estado ferroso por reductores celulares. Está demostrado, que la reducción del Fe^{3+} es llevada a cabo por sustancias tales como FADH_2 (Flavina Adenina Dinucleótido) y la cisteína que permiten que ocurra la reacción de Fenton (Woodmansee e Imlay, 2002).



Esquema 1. Reacción de Fenton, donde el radical anión superóxido reduce el Fe^{3+} , y éste al H_2O_2 , formando el radical OH^\bullet . El Fe no se consume en el proceso actuando como catalizador del mismo. El Cu puede sustituir al Fe.

El OH^\bullet ha sido señalado como el radical oxidante más poderoso que puede reaccionar con la mayoría de las moléculas orgánicas e inorgánicas, ADN, proteínas, lípidos, aminoácidos, azúcares y metales. Estas reacciones implican la extracción, la adición y la transferencia de electrones del hidrógeno. Los radicales hidroxilos se caracterizan por presentar una alta velocidad de reacción y una vida media corta (1 ns) (Halliwell y Gutteridge, 1995).

Anión hipoclorito (ClO^-): es un oxidante poderoso producto de H_2O_2 y Cl^- por enzimas como la mieloperoxidasa (MPO). Su función es oxidar moléculas biológicas mediante la cloración. Su transformación a ácido hipocloroso puede inducir la formación de OH^\bullet .

Peroxinitrito (ONOO^-): es una especie muy reactiva originada por la reacción entre el ON y $\text{O}_2^{\bullet-}$; y es considerada una poderosa especie oxidante para moléculas biológicas.

Además, se puede descomponer a radical hidroxilo ($\text{ONOO}^- + \text{H} + \rightarrow \text{OH} + \text{NO}_2^{\cdot}$) independientemente de la presencia de metales de transición (Green y col., 1990; Hou y col., 1999). Además, la forma protonada (ONOOH) es considerada un potente agente oxidante capaz de reaccionar con grupos sulfidrilos ($-\text{SH}$) como también causar lesiones oxidativas en la mayoría de las biomoléculas de una forma semejante al radical hidroxilo. Asimismo, es responsable del daño provocado en el ADN, oxidación de proteínas y nitrosilación de aminoácidos aromáticos de las estructuras proteicas. Reacciones bioquímicas esenciales que implican óxido nítrico son también S-nitrosación de tioles y nitrosilación de iones de metales de transición (Van Faassen y col., 2005).

1.6.3 La química del estrés oxidativo: especies reactivas y el deterioro de macromoléculas

Las especies reactivas del oxígeno son intermediarios de diversas funciones en diferentes biomoléculas y tienen como objetivo casi todos los sustratos de la célula. Los lípidos más susceptibles de sufrir oxidación son los ácidos grasos poliinsaturados, que conducen a la formación de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonanal, reconocidos marcadores de la alteración oxidativa de los lípidos. Además, estas especies reactivas son capaces de oxidar tanto el esqueleto como la cadena lateral de proteínas. Por su parte, las ERO dañan los ácidos nucleicos, ya que pueden provocar entrecruzamientos, quiebre de las hebras y alteración de la estructura de las bases púricas y pirimidínicas, lo que conlleva a potenciales mutaciones del ADN (Gandhi y Abramov, 2012).

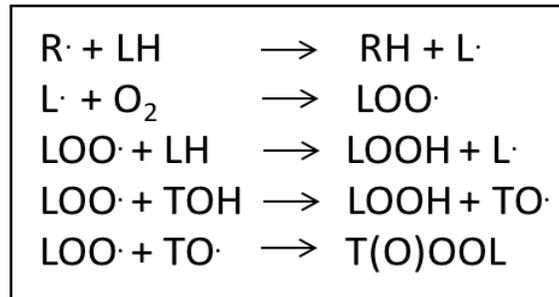
Proteínas: un gran número de proteínas son afectadas por el desequilibrio introducido por ERO, es así como el ataque por estas especies produce modificaciones en las cadenas laterales de los aminoácidos que llevan a alteraciones conformacionales en las proteínas y de este modo interfieren en el metabolismo celular. Al momento, ha sido descrito un abanico heterogéneo de daños oxidativos en proteínas debido a la oxidación de grupos $-\text{SH}$, reducción de disulfuros ($-\text{S-S}-$), oxidación de residuos aminoacídicos, reacciones con aldehídos, modificación de grupos prostéticos y fragmentación de péptidos. Por ejemplo, la formación de enlaces disulfuro después de la oxidación de los residuos cisteína (Cys) da como resultado cambios estructurales asociados a la actividad proteica. La oxidación de residuos Cys en fosfatasa es un blanco importante de los sistemas biológicos, ya que afecta la fosforilación de proteínas y por lo tanto tiene un impacto en el metabolismo celular global (Krumova y Cosa, 2016). Además, las ERO pueden oxidar algunos aminoácidos incluyendo lisina, arginina, prolina y treonina conduciendo a la formación de grupos carbonilo (C=O), y estos luego son utilizados como marcadores de estrés oxidativo (Finkel y Holbrook, 2000; Stadtman, 2006).

Por su parte, el desbalance oxidativo en el citoplasma interfiere en el plegamiento y actividad de las proteínas. Consecuentemente, hay una pérdida de la actividad catalítica de diversas enzimas, modificaciones en los aminoácidos, disminución de la estabilidad térmica, cambios en la viscosidad, fragmentación, formación de uniones proteína-proteína, formación de puentes disulfuro y aumento de la susceptibilidad a la proteólisis (Cabisco y col., 2000).

Ácidos nucleicos: las ERO son una amenaza competente capaz de lesionar espontáneamente el ADN. Éste puede ser blanco tanto de OH[·] como de otros intermediarios reactivos; aunque aproximadamente la mitad de las lesiones son ocasionadas por el radical OH[·], mientras que la mayoría es introducida por ¹O₂ (Simon y col., 2000). Los productos de oxidación de la timina denominados glicoles de timina tienen moderada propiedad mutagénica. Los productos de oxidación de la citosina (glicoles de citosina) son análogos a los de timina y pueden experimentar una reacción secundaria que es la desaminación (Friedberg y col., 1995). Esta desaminación de la citosina produce derivados del uracilo que reaccionan con adenina conduciendo a un aumento del efecto mutagénico. En cuanto a la desoxirribosa, también puede sufrir lesiones cuando las bases están siendo atacadas por radiaciones ionizantes o radicales libres (Dempsey y Harrison, 1994). Este daño puede remover y desplazar una base resultando en la ruptura de la hebra de ADN causando la pérdida de información genética de la hebra afectada (Touati, 2000).

Lípidos: la peroxidación lipídica (PL) es una de las consecuencias del daño oxidativo. Este proceso en cadena comienza con la reacción entre ERO y los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. Tanto en sistemas modelo como en células vivas, ha sido objeto de estudio el papel que desempeñan los radicales peroxilo en el daño generado en el medio celular lipídico. La oxidación de residuos de ácidos grasos poliinsaturados (Esquema 2) da inicio con un radical libre, generalmente, el radical hidroxilo que, tras la reacción con ácidos grasos, genera radicales lipídicos (Yamamoto y col., 1984; Barclay y col., 1984; Cosgrove y col., 1987). A su vez los radicales atrapan fácilmente el oxígeno molecular para formar radicales de tipo peroxilo lipídico, quienes son eficaces en las reacciones de autooxidación en cadena. El proceso de oxidación o PL produce cambios en la configuración (*cis* a *trans*) de las cadenas de ácidos grasos (Krumova y Cosa, 2016), además se forman hidroperóxidos y alcoholes o pueden fragmentarse en aldehídos electrofílicos α , β -insaturados (Esterbauer y col., 1991; Sun y Salomon, 2004) entre otras alteraciones. La peroxidación y la destrucción de los dobles enlaces *cis* pueden conducir a cambios en la fluidez de la membrana y alteraciones en la permeabilidad. Así, la membrana pierde su integridad estructural alterando el gradiente electroquímico de transmembrana de manera tal que se disipa el gradiente de protones en forma total o parcial, conduciendo a la muerte celular. La autooxidación de residuos de ácidos grasos

poliinsaturados genera en última instancia una variedad de productos secundarios citotóxicos que atacan el ADN y las proteínas citoplasmáticas comprometiendo una vez más la integridad celular (Barnham y col., 2004). La PL es probablemente uno de los eventos más relevantes asociados a la muerte celular inducida por radicales libres, tanto por reacción directa de los radicales libres peroxilo, como vía los productos derivados de este proceso, quienes a su vez pueden reaccionar con ADN y proteínas provocando modificaciones oxidativas adicionales (Yoon y col., 2002).



Esquema 2. Proceso de peroxidación lipídica (PL) en presencia de un radical libre ($R\cdot$) iniciador y un ácido graso insaturado (LH) de la reacción en cadena, y α -tocoferol (TOH) como antioxidante involucrado en este proceso. Especies generadas: Radical lipídico ($L\cdot$), radical peroxilo ($LOO\cdot$), hidroperóxido (LOOH), radical tocoperoxil ($TO\cdot$) y finalmente da un producto no radicalario $T(O)OOL$

1.6.4 Sistemas de defensa antioxidantes bacterianos: enzimáticos y no enzimáticos

En las células los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos ayudan a regular la concentración de especies reactivas nocivas. McCord y Fridovich descubrieron y describieron, a finales de los años sesenta, una serie de enzimas responsables de la desintoxicación del oxígeno en los organismos aerobios (McCord y col., 1971). La presencia de tales enzimas permitió explicar que si las ERO no fueran eliminadas, podrían dañar severamente las células en condiciones basales.

La enzima superóxido dismutasa (SOD) fue un descubrimiento histórico en el campo de la biología de los radicales libres (Imlay, 2010). La enzima SOD es la encargada de mantener los niveles de $O_2^{\cdot-}$ por debajo de la concentración de 0,1 nM en la bacteria *Escherichia coli* (Imlay y Fridovich, 1991). La SOD cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a O_2 y H_2O_2 (McCord y Fridovich, 1969) y es utilizada como un marcador de estrés oxidativo.

A lo largo de los años, se han caracterizado nuevos sistemas antioxidantes enzimáticos. Estos incluyen a enzimas como catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), mieloperoxidasa (MPO), tioredoxina reductasa (Trx), entre otras. Estas son, en parte, las responsables de que la concentración en estado estacionario de H_2O_2 sea baja, por ejemplo, que en la bacteria *E. coli* no exceda los 20 nM (Imlay, 2008).

Dentro de los antioxidantes no enzimáticos se destacan los solubles en medio acuoso como glutatión (GSH) y vitamina C, mientras que α -tocoferol (análogo de la vitamina E) tiene carácter lipofílico (Finkel, 2000). El glutatión en las células se mantiene en forma reducida por la enzima glutatión reductasa, además se encuentra en una alta concentración por lo que es considerado un antioxidante de gran relevancia. El ácido ascórbico (Vit C), también es conservado en su forma reducida por glutatión reductasa; el ascorbato es un secuestrante efectivo frente a $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} y 1O_2 . Además, regenera el tocoferol a partir del radical tocoperoxil formado durante la PL (Stahl y Sies, 1997).

El antioxidante α -tocoferol (TOH) es el más importante y más activo de los antioxidantes liposolubles; su función es la de proteger las membranas de las células frente a la oxidación, reaccionando con los radicales lipídicos producidos en la PL. En una primera etapa TOH reacciona con un radical peroxilo (ROO^{\bullet} o LOO^{\bullet}) mediante transferencia de átomos de H para dar un radical tocoperoxil (TO^{\bullet}) y un hidroperóxido $ROOH$ / $LOOH$. Luego, continúa con el acoplamiento de TO^{\bullet} a un segundo radical peroxilo y es así como se produce la segunda reacción de terminación de esta cadena. El TOH media eficazmente dos reacciones radicalarias en cadena (Krumova y col., 2013). El radical tocoperoxil también puede ser eliminado por ascorbato en la interfase de agua-lípidos donde el ascorbato actúa como secuestrante final de ERO. Los radicales oxidados del α -tocoferoxil producidos en este proceso se pueden reciclar a la forma reducida activa a través de la reducción por el ascorbato, el retinol o el ubiquinol (Kagan y col., 2000).

1.7 Antecedentes de la relación entre el estrés oxidativo y la toxicidad antimicrobiana

La interacción de los microorganismos con los antibióticos es compleja. La unión del antimicrobiano a las estructuras bacterianas desencadena una serie de alteraciones y modificaciones en la célula, tanto fisiológicas como morfológicas. La interacción específica antibiótico-blanco ya ha sido descrita para los antibióticos de uso clínico aprobados (Walsh, 2003). Sin embargo, un número considerable de estudios remarcaron que no es correcto atribuir la capacidad antibacteriana a la acción sobre un único sitio blanco.

Antecedentes de nuestro grupo indican que el estrés oxidativo constituye una posible causa de daño generado por varios antimicrobianos en diferentes géneros bacterianos (Bogdanov y col., 1997; Becerra y Albesa, 2002; Albesa y col., 2004; Aiassa y col., 2006). Las ERO formadas a partir de fuentes endógenas y/o exógenas pueden causar lesiones sobre biomoléculas afectando severamente la integridad y viabilidad celular o inducir una variedad de respuestas celulares a través de la generación de especies reactivas secundarias provenientes de la peroxidación lipídica (Condreanu y

col., 2009). Asimismo, para contrarrestar el estrés oxidativo, se ha identificado que las células inducen enzimas que detoxifican estas especies y reparan el efecto causado por ellas (Aiassa y col., 2010; Aiassa y col., 2011).

Wang y Zhao, describieron que las vías de estrés oxidativo están involucradas en la letalidad de fluorquinolonas, beta-lactámicos y aminoglucósidos. Recientemente, se ha propuesto que los antibióticos bactericidas además de interactuar con su sitio blanco clásico estimularían la formación de $\text{OH}\cdot$ mediada por reacciones tipo Fenton que llevan a una situación celular catastrófica (Kohanski y col., 2007). Esto también fue corroborado por otros grupos de investigación, donde describen cómo compuestos bactericidas alteran la respiración y metabolismo celular global generando especies reactivas nocivas que inducen la muerte celular (Dwyer y col., 2015; Belenky y col., 2015).



HIPÓTESIS, OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

1.1 HIPÓTESIS

Teniendo en consideración los antecedentes citados, y con el interés de profundizar el estudio del rol del estrés oxidativo como un factor clave en el mecanismo de acción de antibióticos de uso clínico y nuevas drogas, la hipótesis de trabajo que motivó la realización de esta tesis de doctorado fue:

“Antibióticos de uso clínico y nuevos derivados de síntesis afectarían el equilibrio oxidativo bacteriano contribuyendo a la muerte celular, así como también podrían inducir estrés en células eucariotas”.

1.2 OBJETIVOS GENERALES

Las células bacterianas y eucariotas sufren el impacto de diferentes sustancias, que conducen a la producción descontrolada de especies reactivas, por lo que es necesario profundizar en el conocimiento del desequilibrio oxidativo provocado para explicar diversos fenómenos biológicos.

Los objetivos generales están dirigidos a contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas mediante el estudio de la generación de estrés oxidativo por la acción de antibióticos de uso clínico y de nuevos compuestos de síntesis en patógenos de relevancia clínica. También se enfoca en la detección de potenciales efectos nocivos en células sanguíneas.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos planteados fueron los siguientes:

- ∂ Estudiar el desequilibrio oxidativo inducido por el antibiótico bacteriostático Linezolid en cepas productoras de biofilms y en cultivos planctónicos
- ∂ Indagar las lesiones oxidativas provocadas por el antibiótico bactericida ciprofloxacina e investigar el efecto de la adición de un antioxidante externo
- ∂ Investigar la susceptibilidad de cepas de referencia y cepas clínicas a derivados de bencenosulfonilos de heterociclos y relacionarla con la capacidad de generar estrés oxidativo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: PARTE I

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados previamente, surgieron las siguientes preguntas como parte del primer objetivo específico de esta tesis: ¿Cómo será el perfil de actividad de LZD en cepas de referencia y clínicas de *Staphylococcus aureus*?, ¿LZD inducirá la generación de especies reactivas en biofilms de *S. aureus* meticilino resistentes (SAMR)?, y ¿Será LZD un antibiótico útil para la erradicación de estos conglomerados celulares de SAMR?

1.1 Evaluación de la producción de biofilm en cepas de referencia y clínicas de *S. aureus*

El ensayo de cuantificación de biomasa total, con el colorante CV, permitió determinar la cantidad de biomasa producida por cada una de las cepas evaluadas. La Figura 1 muestra los valores obtenidos para las 7 cepas estudiadas.

El experimento reveló una mayor producción de biomasa en las cepas SAMR 2 y SAMR ATCC 43300 comparado con las cepas SAMR 3, SAMR 4 y SAMS 5; mientras que SAMS ATCC 29213 reveló una producción moderada y la cepa que presentó la máxima producción de biomasa fue SAMR 1. Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos fueron interpretados de acuerdo con la escala establecida por Baldassarri y col. (1993), donde la cuantificación de biomasa total es: alta ($> 0,24$), baja ($> 0,12$ y $< 0,24$) o negativa ($< 0,12$). Las cepas meticilino resistentes exhibieron un amplio rango de producción de biomasa total, con valores entre 0,24 (SAMR 3) hasta 1,15 (SAMR 1). Todas las cepas manifestaron ser buenas productoras de biofilm de acuerdo con las escalas establecidas.

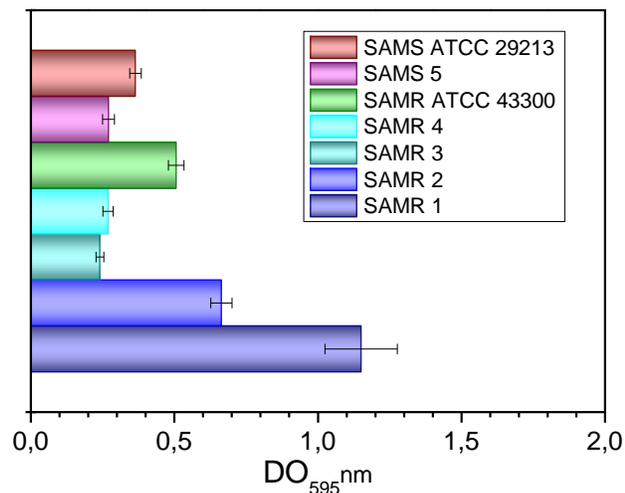


Figura 1. Cuantificación de la producción de biofilm en cepas clínicas y de referencia de *S. aureus*, mediante la tinción con el colorante CV. En el eje “y” se exponen las cepas evaluadas en función de los valores arrojados de densidad óptica (DO).

Por otro lado, se evaluaron los perfiles de incremento de actividad metabólica de las 4 cepas (SAMR 1, SAMR 2, SAMR ATCC 43300 y SAMS ATCC 29213) que exhibieron mayor producción de biofilm por el ensayo de CV. Los experimentos se realizaron a las 0, 2, 4, 6, 12 y 24 h de incubación (Figura 2) mediante el ensayo con la sal de tetrazolio "XTT". La cepa SAMR 1 reveló una actividad metabólica superior, mostrando un crecimiento constante hasta las 24 h. En el caso de SAMR 2, inicialmente, evidenció la misma tendencia que SAMR 1 hasta las 15 h de incubación. Ambas cepas de referencia presentaron un crecimiento exponencial semejante, entrando en fase estacionaria luego de las 12 h.

Cabe destacar que los aislamientos clínicos, mostraron un aumento de la actividad metabólica desde las etapas iniciales, entre los tiempos 0 y 4 h, de inducción de biofilm. Las dos cepas de referencia ATCC, exhibieron un patrón de crecimiento análogo desde el inicio del experimento. En general, se observó una fase lenta de inducción, hasta las 6 h, con un incremento en el crecimiento hasta las 12 h. Posterior a las 12 h, no se observó un cambio significativo en el crecimiento, se identificó que ambas cepas entraron en un estado estacionario.

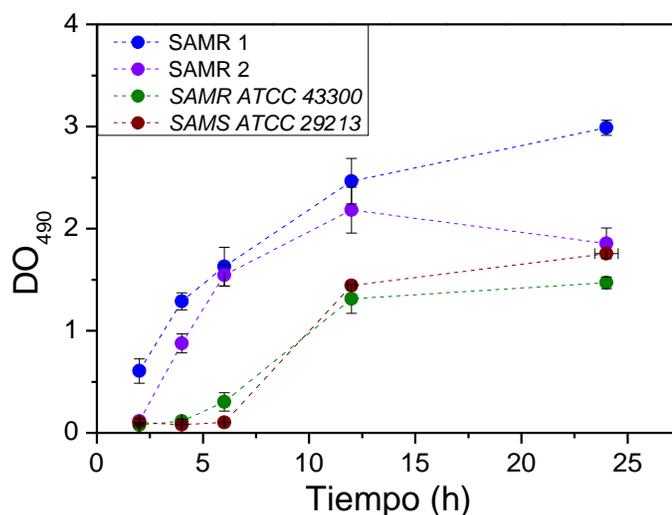


Figura 2. Actividad metabólica durante las fases de crecimiento del biofilm en dos cepas de referencia, una sensible y otra resistente a meticilina, SAMS ATCC 29213 y SAMR ATCC 43300; y dos cepas clínicas resistentes a meticilina, SAMR 1 y SAMR 2.

El patrón de crecimiento de los aislamientos clínicos fue superior a las cepas de referencia, las últimas exhibieron un crecimiento moderado. Teniendo en cuenta que las células del biofilm se organizan en comunidades embebidas en una matriz extracelular, la actividad metabólica depende de la disponibilidad de nutrientes y

oxígeno, junto con la eliminación de metabolitos de desecho. Todos estos factores pueden variar de acuerdo con las características de cada cepa productora de biofilm (Donlan y Costerton, 2002). Las diferencias en el crecimiento se podrían atribuir a la producción de EPS y a las características inherentes de cada cepa.

1.1.2 Estudio de la eficiencia de erradicación de LZD en biofilm maduros de *S. aureus*

En primer lugar, se determinó la susceptibilidad de cada una de las cepas frente a LZD. Las CIM obtenidas fueron de 2 µg/mL para SAMR 1, SAMR 2, SAMR 3, SAMS 5 y SAMS ATCC 29213; por su parte SAMR ATCC 43300 y SAMR 4 exhibieron valores de 1 µg/mL.

Como se mencionó previamente, las 4 cepas que exhibieron los mayores valores de biomasa total se expusieron al tratamiento con el antibiótico (10xCIM y 100xCIM). Sin embargo, en una primera instancia, para comprender el efecto de LZD en el crecimiento del biofilm, se indujo la formación de biofilm en presencia de una concentración sub-CIM de LZD. Los aislamientos clínicos SAMR 1, SAMR 2, las cepas de referencia SAMR ATCC 43300 y SAMS ATCC 29213 mostraron un porcentaje de inhibición respecto del control (muestra no tratada) de 51,6%, 77,3%, 29,2% y 29,4%, respectivamente. Al mismo tiempo, el biofilm maduro se expuso a LZD y los resultados de inhibición arrojados por la tinción con CV, fueron entre 13% y 57 % para las 4 cepas seleccionadas (resultados no ilustrados).

Las diferencias entre los resultados obtenidos podrían atribuirse a las características de la matriz del biofilm maduro, debido a que ésta interfiere en el acceso de antibióticos reduciendo el contacto físico entre el agente antimicrobiano y las células planctónicas (Gilbert y col.; 1997; Donlan y Costerton, 2002). Por este motivo los valores de inhibición obtenidos difieren entre las cepas. Se ha informado que la manera en que se induce la producción de biofilm podría tener impacto en la capacidad antimicrobiana del agente en cuestión (Wu y col., 2014). En relación con esto, Schilcher y col. (2016) demostraron que el antibiótico clindamicina presenta diversos efectos sobre la formación de biofilm de *S. aureus* a concentraciones sub-inhibitorias. El estudio se realizó sobre la cepa modelo LAC wt (esta mutante tiene una delección completa del locus *agr*, éste modula la composición de la matriz y la adhesión) del linaje clonal USA300. Así, lograron evidenciar, a las concentraciones de estudio (sub-CIM), como se alteraba la composición de la matriz extracelular aumentando la lisis y la liberación extracelular de ADN. Estos aspectos produjeron un aumento de los factores de adhesión y proteínas secretadas, que probablemente conducen a una interacción entre los componentes de la matriz, pudiendo dar lugar a un biofilm consolidado y estable. Por lo que, para prevenir este efecto, las dosis de clindamicina a las que se debe tratar a los pacientes que padecen infecciones

asociadas a biofilm debe ser elevada. Estudios previos, han descrito que la lisis celular y la liberación de ADN son críticas para la fijación del biofilm durante las etapas iniciales de desarrollo, mientras que el ADN liberado (eDNA) continúa siendo un componente de gran relevancia para la matriz durante la etapa de maduración (Rice y col., 2007; Mann y col., 2009).

Para discriminar entre células viables y muertas en el biofilm luego de 24 h de tratamiento con LZD se cuantificó la actividad metabólica por el ensayo XTT. Los tratamientos se realizaron con las concentraciones 10xCIM y 100xCIM, no se observó una diferencia significativa entre ambas concentraciones en ninguna de las cepas estudiadas. Los porcentajes de inhibición luego de 24 h de exposición al antibiótico respecto de los controles (muestra sin tratar) fueron: 80%, 54%, 55% y 10% para SAMR 1, SAMR 2, SAMR ATCC 43300 y SAMS ATCC 29213. Estos valores fueron superiores a los arrojados por el ensayo de tinción de la biomasa. Asimismo, se realizó la cinética de inhibición del biofilm preformado expuesto a LZD (10xCIM) por 24 h (Figura 3) para comprender mejor el perfil inhibitorio del antibiótico.

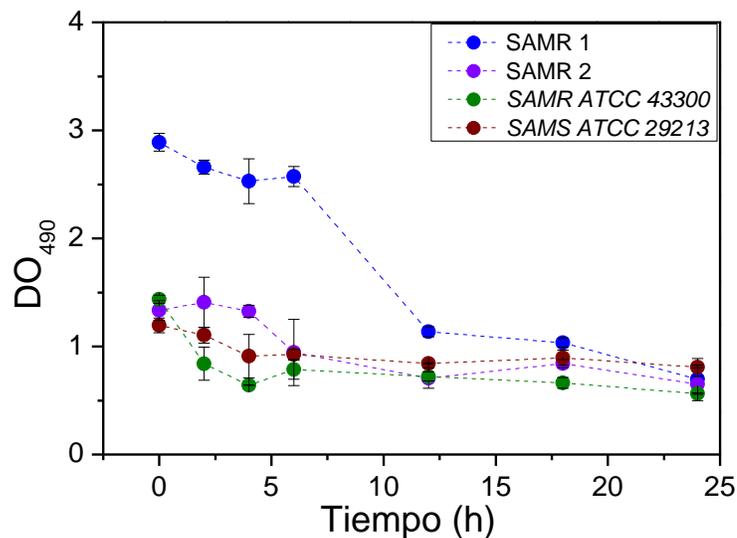


Figura 3. Curva de inhibición del biofilm preformados de *S. aureus* mediante la evaluación de la viabilidad celular. Los biofilms maduros fueron expuestos a LZD (10xCIM) a 0, 2, 4, 6, 12, 18 y 24 h.

En correlación con los datos obtenidos por otros ensayos, la cepa SAMR 1 indujo la mayor producción de biofilm. Además, se destaca una reducción del 76% de la actividad metabólica comparada con su respectivo control a la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10xCIM) después de 24 h de exposición. Sin embargo, este efecto de inhibición de la actividad metabólica del biofilm se comienza a observar luego de 12 h y la disminución fue del 61%. Por su parte, SAMR 2 mostró un comportamiento similar a SAMR 1, se observó una reducción del 47 % a las 12 h y se proyectó a un 51% al final

de la exposición. En el caso de las cepas de referencia, la inhibición de la actividad fue de 60,8% y 32%, a las 24 h, en SAMR ATCC 43300 y SAMS ATCC 29213, respectivamente.

Complementariamente, se investigó por microscopía electrónica de barrido la formación y eliminación de estos conglomerados celulares en la cepa clínica que exhibió mayor producción de biofilm (SAMR 1) y en la de referencia resistente a meticilina. La Figura 4A corresponde a SAMR 1 control, en donde se apreció una matriz de una alta densidad presentando mayores agrupaciones tridimensionales dispersas por todo el cubreobjetos. En contraste, la cepa de referencia, SAMR ATCC 43300 (Figura 4E) reveló una matriz menor y exhibió grupos de células diseminadas en toda la superficie. Los biofilms maduros de ambas cepas fueron tratados con LZD (10xCIM) por 12, 18 y 24 h, con la finalidad de estudiar los tiempos necesarios de incubación para alcanzar la eliminación del biofilm. SAMR 1 luego de 12 h, mostró una reducción del volumen de grupos celulares (Figura 4B), seguido de una disminución total de estos conglomerados, sólo se observaron reducidas agrupaciones de células (Figura 4C). A las 24 h de tratamiento, se apreció un remanente de cocos adheridos y aislados. La cuantificación de los porcentajes de erradicación, calculados por área de recubrimiento (Tabla 1), fueron: 34,7%, 98,2% y 99,8% a los tiempos de incubación de 12, 18 y 24 h, respectivamente. En el caso de la cepa de referencia (SAMR ATCC 43300), los valores de eliminación de biofilm fueron de 83,8% y 80,8% a las 12 y 18 h de exposición a LZD (Figura 4F y 4G). Sólo un número mínimo de cocos se percibió a las 24 h, el porcentaje de erradicación respecto del control no tratado fue de 98,6% (Figura 4H).

Tabla 1. Valores calculados por área de recubrimiento mediante el programa FIJI-Imagej.

TIEMPO HORAS	AREA μm^2		% AREA OCUPADA	
	SAMR 1	SAMR ATCC 43300	SAMR 1	SAMR ATCC 43300
0	2133,6	2159,6	77,0	77,9
12	1392,8	350,7	50,3	12,6
18	37,7	414,2	1,4	14,95
24	4,3	28,5	0,1	1,0

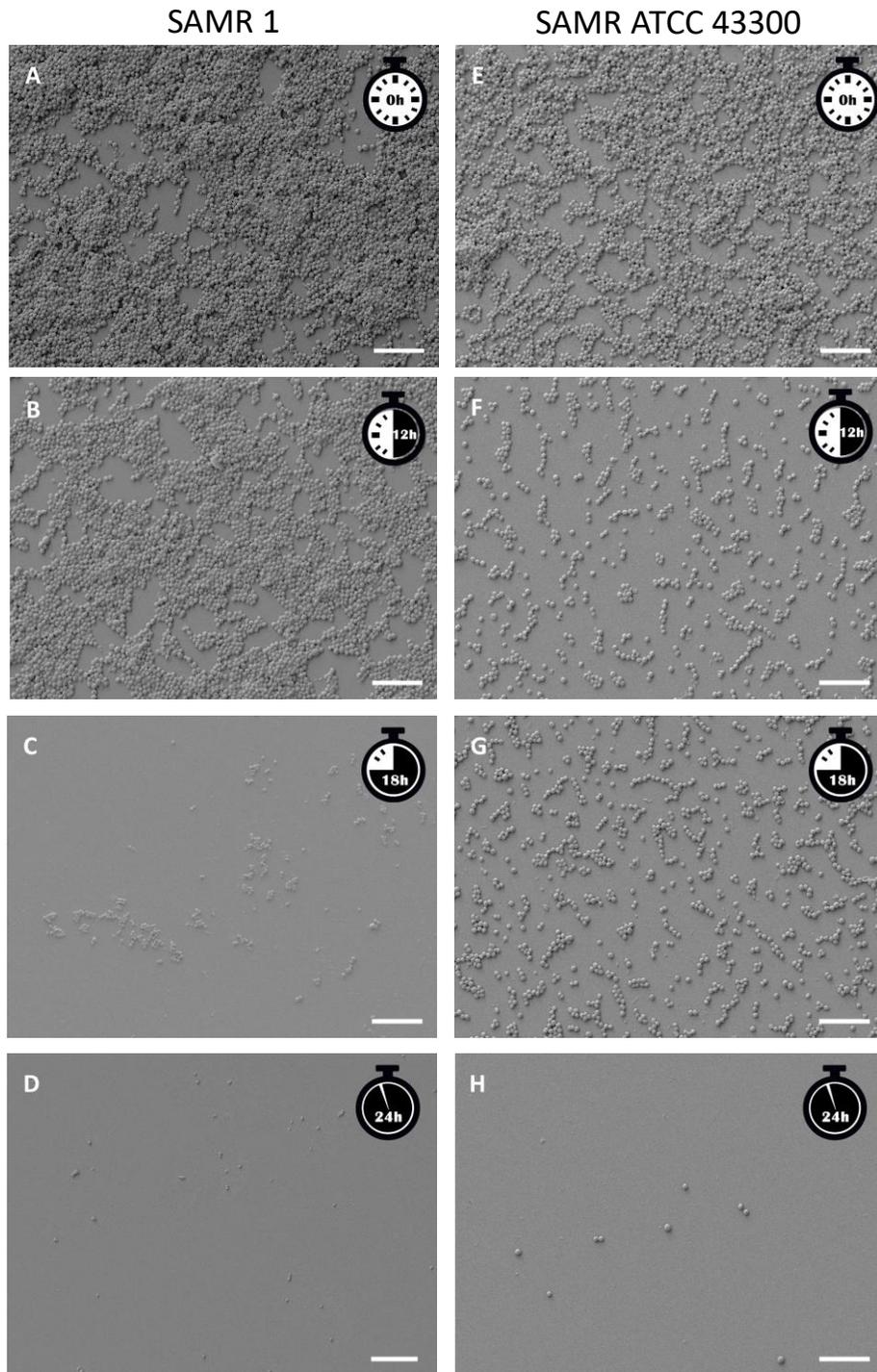


Figura 4. Erradicación del biofilm causada por LZD en el tiempo. Se capturaron imágenes de SAMR 1 y SAMR ATCC 43300 por SEM. Controles de las cepas sin tratar SAMR 1(A) y SAMR ATCC 43300 (E). Biofilms maduros expuestos a LZD a 10xCIM por 12 h (B y F), 18 h (C y G) y 24 h (D y H) de SAMR 1 (columna izquierda) y SAMR ATCC 43300 (columna derecha). En blanco se muestra la barra de escala: 10 μm .

Los resultados sugieren que el antibiótico LZD logró afectar la estructura y adhesión celular a la superficie del cubreobjetos. Asimismo, las imágenes otorgaron información sobre la densidad de estos conglomerados de células y de la matriz EPS (Figura 4A y 4E). La cepa clínica reveló una marcada producción de EPS (Figura 5A magnificada), como de agrupamientos de células en general.

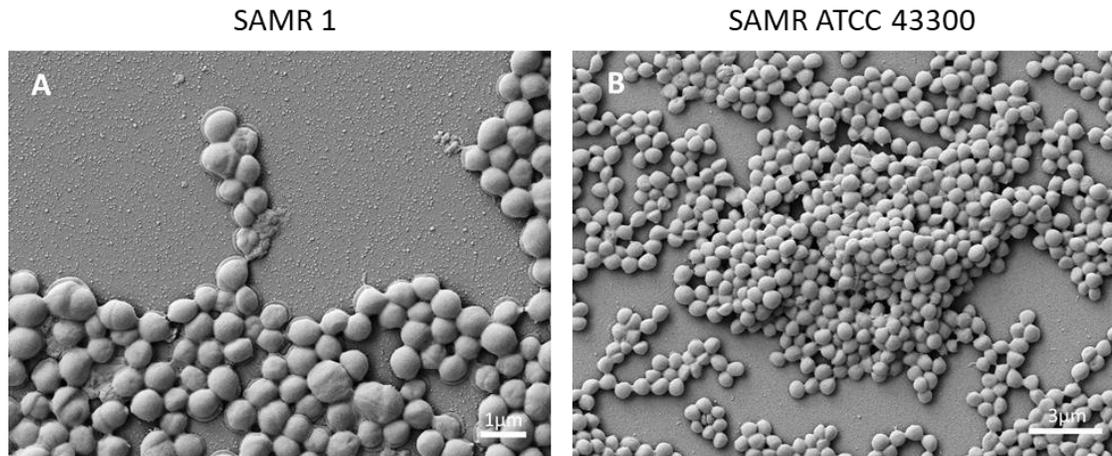


Figura 5. Imágenes SEM de la cepa clínica SAMR 1 (A) y de referencia SAMR ATCC 43300(B) en condiciones basales. La barra blanca representa la escala: 1 μm (A) y 3 μm (B).

Las imágenes de SEM mostraron la capacidad antibiofilm de LZD. Utilizando las micrografías obtenidas a diferentes tiempos de tratamiento con LZD se logró visualizar que el antibiótico atraviesa la matriz de EPS y como resultado se observó una disminución en la agregación celular causando desarreglo entre las células y posterior disrupción final del biofilm.

Al momento se ha descrito múltiples factores que influyen en la producción de biofilm en cepas de *S. aureus* (Götz, 2002). Benkeen y col. (2004) demostraron los 3 genes principales reguladores del crecimiento del biofilm: *icaADBC*, el gen regulador accesorio *agr* y *sarA*; estos codifican para enzimas involucradas en la síntesis de adhesinas; modulación de la composición de la matriz y adhesión; expresión de factores de virulencia asociados a la formación y adhesión del biofilm, respectivamente. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, en el que se muestra un crecimiento y distribución heterogénea del biofilm, podrían atribuirse a diferencias en la expresión y regulación de los genes mencionados previamente.

Otros autores han focalizado sus estudios en el desempeño de LZD frente a diversos tipos de cepas productoras de biofilm, en combinación sinérgica con, por ejemplo, N-acetilcisteína (Leite y col., 2013); diversos antimicrobianos, daptomicina, fosfomicina, levofloxacina (Chai y col., 2016) y rifampicina (Baldoni y col., 2009; Wu y col., 2013; Jorgensen y col., 2016). En el caso de rifampicina asociada a LZD, observaron un efecto sinérgico potente. Así, obtuvieron el mejor perfil de eliminación de biofilms y muerte de células planctónicas, en contraste a otras combinaciones de

antibióticos (Baldoni y col., 2009). Al mismo tiempo, se estudió esta combinación para el tratamiento de infecciones asociadas a implantes. Cabe destacar que la concentración del antibiótico bacteriostático fue de 4xCIM asociado a rifampicina, mientras que las condiciones obtenidas en el trabajo de tesis fueron sólo a 10xCIM utilizando únicamente LZD y se logró una eliminación del 99,8% respecto del control en SAMR 1. Otros estudios realizados *in vivo*, con un modelo de neumonía experimental en cerdos asociado a SAMR mostró que LZD logró una respuesta superior a vancomicina, atribuyéndose al mejor perfil farmacocinético y farmacodinámico de LZD (Luna y col., 2009). También, Soriano y col. (2007) sugieren a LZD como una alternativa oral terapéutica efectiva, sus estudios se realizaron con 85 pacientes que presentaban infecciones en implantes ortopédicos. Además, Fernández-Barat y col. (2012) investigaron el tratamiento sistémico con LZD en un modelo de neumonía traqueal en cerdos por SAMR, demostrando que esta oxazolidinona limita el desarrollo de biofilms.

1.1.3 Investigación de la inducción de especies reactivas generadas en biofilms maduros de S. aureus por LZD

La capacidad de inducir ERO y ERN se investigó por espectrofluorometría post tratamiento con LZD a las concentraciones de 10xCIM y 100xCIM, y en diferentes períodos de incubación (2, 4, 6, y 10 h). Los resultados obtenidos demostraron que a las 4 h de incubación con 100xCIM (Figura 6), se percibió una diferencia en la producción de especies reactivas significativa. El valor de porcentaje de aumento de especies reactivas a la concentración de 100xCIM fue: en SAMR 1 de 11,5%; SAMR 2 de 12,3%; SAMR ATCC 43300 23,7% y SAMS ATCC 29213 de 22,9%. Estos resultados indicaron una mínima inducción de estrés oxidativo provocada por LZD, debido a que sólo se observó este efecto a una concentración 10 veces superior a la concentración necesaria para erradicar el biofilm y siendo mínimo el estrés generado a la dosis requerida para el efecto antibiofilm.

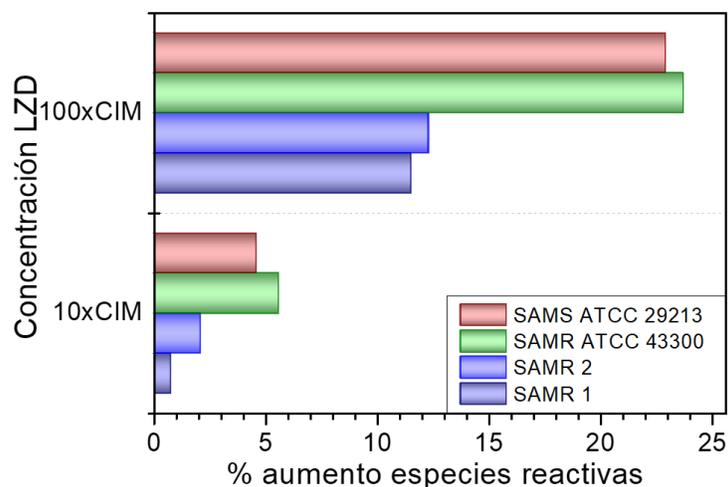


Figura 6. Porcentaje de aumento de especies reactivas cuantificadas como ERO y ERN respecto del control (sin tratar) posterior a 4 h de exposición a LZD a las concentraciones de 10xCIM y 100xCIM.

Diversos autores han reportado al estrés oxidativo cómo un factor que contribuye en la muerte celular. Sin embargo, este efecto ha sido mayoritariamente descrito en cultivos planctónicos. Al momento, no existen reportes de generación de estrés oxidativo causado por antibióticos bacteriostáticos en cepas de *S. aureus* productoras de biofilm.

Por otro lado, ha sido ampliamente estudiado el metabolismo anaeróbico de las bacterias embebidas en el biofilm, inclusive es uno de los motivos a los que se asocia la resistencia a antimicrobianos (Costerton y col., 1995). Teniendo en cuenta esta limitación de oxígeno hacia el interior del biofilm, los procesos respiratorios se ven restringidos y, en consecuencia, disminuye el metabolismo oxidativo y la producción de especies reactivas. Los resultados obtenidos con LZD podrían adjudicarse a este efecto de anaerobiosis en estos conglomerados celulares.

Hasta el momento, los resultados obtenidos con LZD demostraron que es un potente agente antibiofilm a concentraciones usadas en tratamientos clínicos (10xCIM) para erradicación de patógenos tipo SAMR. Sin embargo, la generación de ERO y ERN no fue significativa a la concentración de erradicación (Figura 7).

Estas conclusiones, dieron origen a la siguiente publicación científica: “Linezolid as an eradication agent against assembled methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms”. Martínez SR, Rocca D, Aiassa V, Becerra MC. *RSC advances*. **2016**; 6:101023-28.

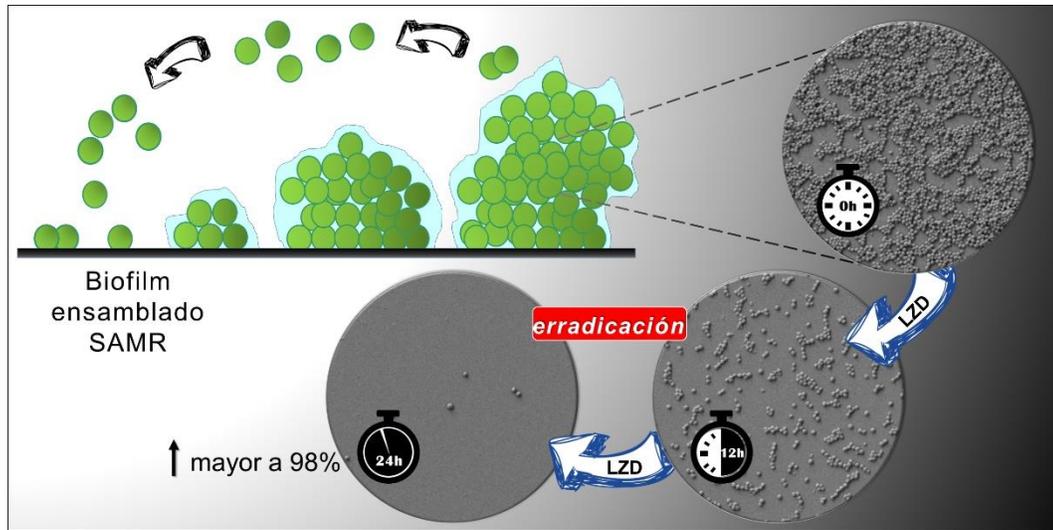


Figura 7. Linezolid como agente antibiofilm a 10xCIM frente a cepas SARM. La erradicación observada fue superior al 98% luego de 24 h de exposición.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos respecto de la inducción de estrés oxidativo en las cepas de *S. aureus* productoras de biofilm y considerando que, al momento, no se ha descrito la inducción de estrés oxidativo por parte de LZD en bacterias, se planteó continuar el estudio de la generación de estrés oxidativo como parte de las alteraciones fisiológicas inducidas producto del tratamiento con LZD en cultivos planctónicos.

A partir de los resultados obtenidos, surgieron las siguientes incógnitas: ¿Existirá diferencia entre cepas de referencia y cepas clínicas en la respuesta oxidativa al antibiótico?, ¿La inducción de especies reactivas estará relacionada a algún perfil genético particular de las cepas del género *S. aureus*?, y ¿La producción de ERO y ERN será un evento aleatorio en el caso de este antibiótico bacteriostático? Estas preguntas pudieron ser abordadas utilizando 28 cepas clínicas, sensibles y resistentes a metilicina, caracterizadas genéticamente. Las cepas fueron provistas y seleccionadas por la Prof. Dra. Claudia Sola (miembro de la comisión asesora de tesis) quien facilitó los medios, para dar luz a algunos de nuestros interrogantes.

1.2 Investigación de la inducción de estrés oxidativo en cultivos planctónicos de *S. aureus*

1.2.1 Evaluación del perfil de actividad antibacteriana de LZD en cultivos planctónicos de cepas clínicas de *S. aureus* caracterizadas genéticamente

La CIM se realizó de acuerdo con las normas internacionales del CLSI, que establece como cepas sensibles a aquellas con CIM ≤ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y resistentes cuando la CIM es ≥ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En este caso, todas las cepas estudiadas presentaron sensibilidad a LZD, cabe destacar que su resistencia a meticilina es de carácter independiente. Los valores de CIM obtenidos fueron entre 1 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la tabla 2 se exponen los resultados de CIM.

Tabla 2. Resultados de CIM de LZD de *S. aureus* sensibles y resistentes a meticilina.

CEPA	CIM	CEPA	CIM
SAMR ATCC 43300	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SAMS ATCC 29213	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SAMR 1	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SAMS 13	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SAMR 2	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SAMS 14	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SAMR 3	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SAMS 15	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SAMR 4	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SAMS 16	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SAMR 5	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SAMS 17	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SAMR 6	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SAMS 18	4 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SAMR 7	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SAMS 19	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SAMR 8	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SAMS 20	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SAMR 9	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SAMS 21	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SAMR 10	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SAMS 22	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SAMR 11	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SAMS 25	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SAMR 12	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SAMS 26	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SAMR 23	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$		
SAMR 24	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$		
SAMR 27	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$		
SAMR 28	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$		

1.2.2 Determinación de la generación de ERO y ERN

Inicialmente, se realizó un *screening* de producción de especies reactivas en las cepas de referencia SAMS ATCC 29213 y SAMR ATCC 43300. Se aplicaron técnicas colorimétricas de detección de $O_2^{\cdot-}$ (radical anión superóxido) y ERN. También, se utilizó la microscopía de fluorescencia para determinación de especies de oxígeno y nitrógeno conjuntamente. Estas metodologías se realizaron por diferentes períodos de incubación (2, 4, 6, 12 y 24 h) con la finalidad de realizar un seguimiento de la producción de especies reactivas en el tiempo. La cepa de referencia SAMS ATCC 29213 mostró un porcentaje de aumento de $O_2^{\cdot-}$ del 18% respecto del control sin tratar a las 24 h y a valor sub-CIM (Figura 8). En el caso de SAMR ATCC 43300, el valor fue del 14% también a la supra-CIM a las 4 h de exposición.

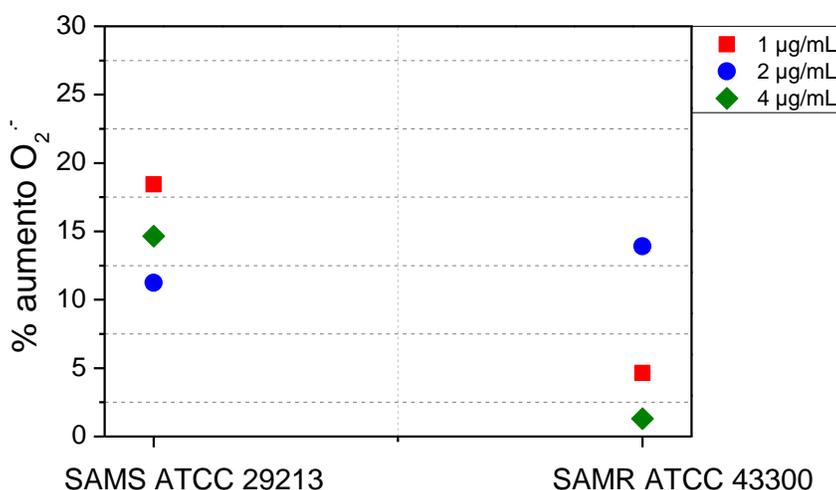


Figura 8. Porcentaje de aumento de $O_2^{\cdot-}$ inducido por LZD (1, 2 y 4 µg/mL) en cepas de referencia de *S. aureus* respecto del control no tratado.

Por su parte, los valores de ERN normalizados obtenidos, respecto del control fueron 2,05 veces superior para SAMS ATCC 29213 a valor CIM y la concentración supra-CIM de 3,01 para SAMR ATCC 43300 (Figura 9). A diferencia de los resultados obtenidos por el ensayo de detección de anión radical superóxido, en el caso de ERN se observó una mayor generación en la cepa meticilino resistente.

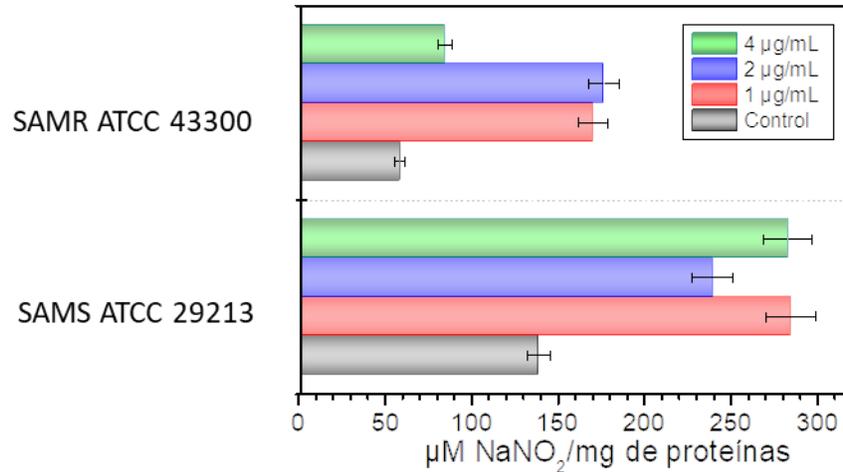


Figura 9. Producción de NO₂⁻ (expresado como μM de NaNO₂/ mg de proteínas) en función de la concentración de LZD (1, 2 y 4 μg/mL).

Por microscopía de fluorescencia, sólo en la cepa sensible a meticilina se observó estrés respecto al control no tratado (Figura 10). La cepa SAMR ATCC 43300 exhibió fluorescencia débil por esta metodología motivo por el cual las imágenes no están ilustradas como figura.

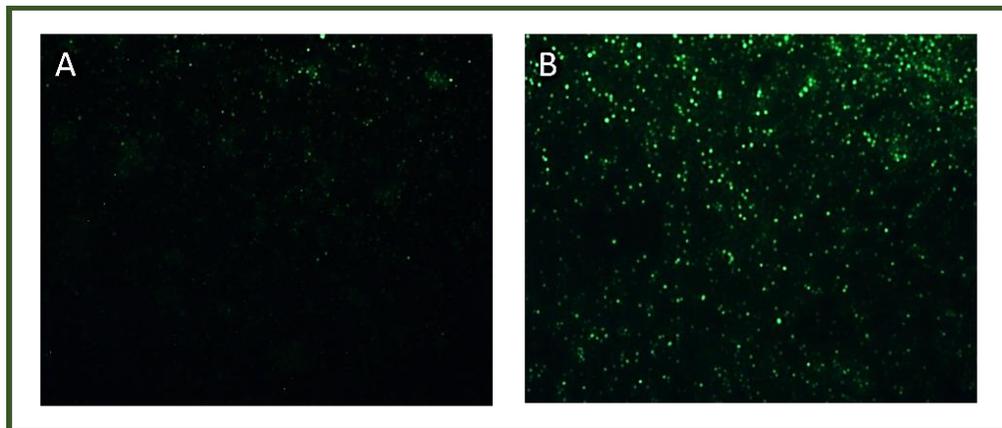


Figura 10. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de SAMS ATCC 29213 tratado con LZD luego de 24 h de incubación. La Figura A responde al control sin tratar y B es la cepa incubada con LZD.

Las 28 cepas clínicas se expusieron a LZD en el rango de concentraciones de 1 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 4 y 24 h de incubación. Estos tiempos se seleccionaron en base a los datos obtenidos previamente con las cepas de referencia (Figura 8 y 9). En la Figura 11 se detalla la totalidad de cepas utilizadas, círculo interior, de SAMS (izquierda) y SAMR (derecha). En la capa externa de la gráfica se observa la proporción de cepas que han mostrado producción de especies reactivas a las 4 y 24 h de incubación con LZD; mientras que sin cambio (SC), indica aquellas cepas que no presentaron inducción respecto del control. En el caso de las cepas SAMS, el 61,5% no revelaron generación de especies reactivas; el 23,1% presentó elevación de especies reactivas respecto del control a las 24 h y el 15,4% restante a las 4 h de tratamiento. Por su parte, los porcentajes de cepas SAMR que presentaron un aumento respecto del control fueron 41,2% y 35,3% a las 4 y 24 h de tratamiento, respectivamente; sólo el 23,5% no manifestó efecto respecto del control (SC). Cabe destacar, que aquellas cepas que presentaron generación de especies reactivas no se identificó una correlación entre sus perfiles genéticos. En los casos en los que se identificó producción de especies reactivas, los porcentajes de aumento en estas cepas respecto de sus controles fueron menores al 35%.



Figura 11. Proporciones de cepas SAMR y SAMS que exhibieron producción de especies reactivas a las 4 y 24 h. Cepas en las que no se generó estrés oxidativo (sin cambio: SC).

Los primeros informes asociados a estrés oxidativo se expusieron en trabajos realizados *in vitro*, donde se describió que tanto antibióticos bactericidas como bacteriostáticos estimulan la formación de oxígeno reactivo en presencia de pequeñas cantidades de metales como Cu o Fe, dado que, la generación de estrés oxidativo causada por antibióticos de uso clínico se relacionó a la química Fenton en primer

lugar (Gutteridge y col., 1998). Estudios posteriores con antibióticos bacteriostáticos tales como cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina y rifampicina no mostraron producción del radical hidroxilo como parte de la inducción de estrés oxidativo y daño celular (Kohanski y col., 2007), en comparación con antibióticos bactericidas, que independientemente de su mecanismo de acción, promueven este radical (OH^\cdot) como producto final del daño oxidativo. De esta manera, las especies reactivas impactan en la muerte celular bacteriana a través de la perturbación del ciclo de los ácidos tricarbónicos, provocan un agotamiento de NADH y la desestabilización de los complejos de Fe-S de las proteínas, liberando Fe^{2+} y estimulando la reacción de Fenton. Por su parte, Albesa y col., (2004) identificaron la generación de radical anión superóxido producida por cloranfenicol (rango de concentraciones evaluadas 0,5 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en cepas de *S. aureus* de modo dosis-dependiente. Estos resultados están en concordancia con los datos presentados en este capítulo de tesis. No obstante, en el estudio mencionado se trabajó con una única cepa de *S. aureus* sensible a meticilina y cloranfenicol.

Otros autores destacan que ERO contribuyen a la acción antimicrobiana dependiendo del tipo de antibiótico y tiempo al que se enfrenta a un microorganismo (Zhao y col., 2015). Los autores sugieren que un conjunto de factores de la célula, permiten inducir muerte celular basada en el nivel de deterioro provocado por el desequilibrio oxidativo. Los investigadores plantearon que dependiendo del costo energético que implica la reparación del daño celular causado, la célula puede utilizar la muerte mediada por estrés como una vía que acompaña el mecanismo de acción principal del antibiótico (Wu y col., 2011; Dwyer y col., 2012; Fang, 2013).

1.2.3 Identificación de alteraciones producidas por ERO y ERN en la capacidad antioxidante total (FRAP), enzima superóxido dismutasa (SOD) y productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP)

Las cepas caracterizadas genéticamente que presentaron mayor producción de especies reactivas se seleccionaron para los ensayos de FRAP, SOD y AOPP. La prueba de FRAP se aplica para identificar el potencial antioxidante total de un sistema cuando éste se encuentra bajo un estado de estrés oxidativo (Benzie y Strain, 1996). Por su parte, la inducción de la enzima SOD se considera un marcador de estrés oxidativo agudo (Biagini y col., 1995), mientras que los AOPP se utilizan para identificar la vulnerabilidad de las proteínas a las especies reactivas nocivas como un parámetro de daño proteico *in vitro* (Capeillère-Blandin y col., 2004). La finalidad de evaluar estos sistemas radicó en la búsqueda de un entendimiento del comportamiento fenotípico observado, dado que no se pudo comprobar una relación entre la generación de estrés y las características genéticas de las cepas seleccionadas.

Se evaluaron 8 cepas SAMR y 4 cepas SAMS. Las cepas fueron: SAMR 1, SAMR 5, SAMR 9, SAMR 23, SAMR 24, SAMR 27, SAMR 28, SAMR ATCC 43300, SAMS 15, SAMS 16, SAMS 22 y SAMS ATCC 29213. La Figura 12 exhibe el comportamiento del FRAP cuando las cepas fueron tratadas con LZD en concentraciones crecientes durante 4 h, donde no se observó un efecto dosis-dependiente y hubo una marcada disminución del FRAP en todas las condiciones evaluadas.

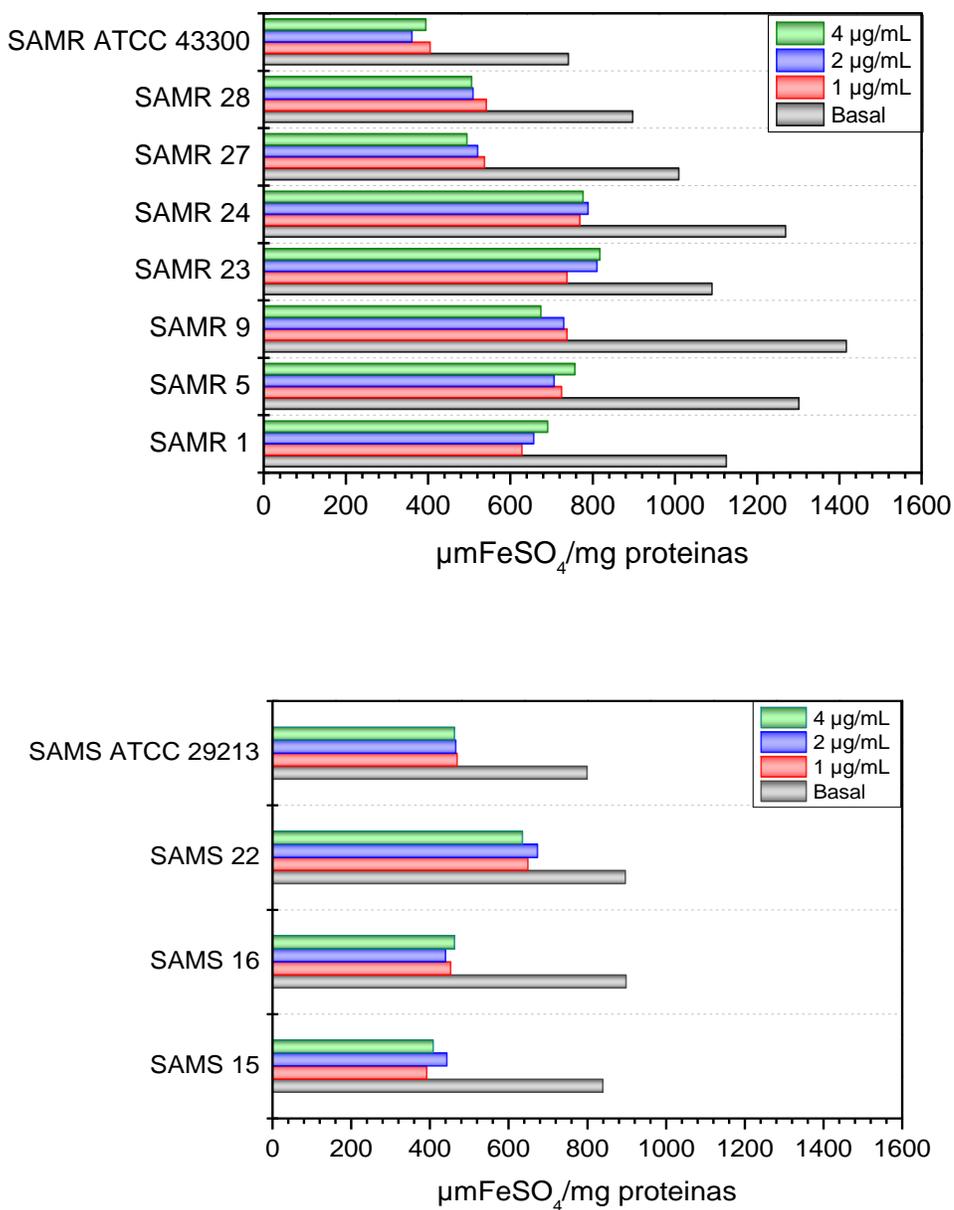


Figura 12. Evaluación de la capacidad antioxidante total (FRAP) en cepas de *S. aureus* incubadas con LZD por 4 h. En la gráfica superior se representan las cepas SAMR y en la inferior las cepas SAMS. Los tratamientos, en su totalidad, fueron significativos respecto del basal *(p<0,05).

Posteriormente, la actividad de la enzima SOD se evaluó en las cepas, con el propósito de identificar si el estrés detectado activó este sistema de defensa antioxidante enzimático. Los resultados de la Figura 13 representan la activación enzimática para cada cepa tratada con concentraciones crecientes de LZD en función de las unidades SOD/mg de proteína. La activación enzimática se identificó como un efecto dosis-dependiente, asimismo los valores de unidades basales de SOD en estas cepas no siguieron un patrón de comportamiento entre sensibles y resistentes a meticilina y fueron en cada caso diferentes. En contraste, con lo observado en el ensayo de FRAP (Figura 12), en el que los valores basales fueron superiores en las cepas meticilino resistentes.

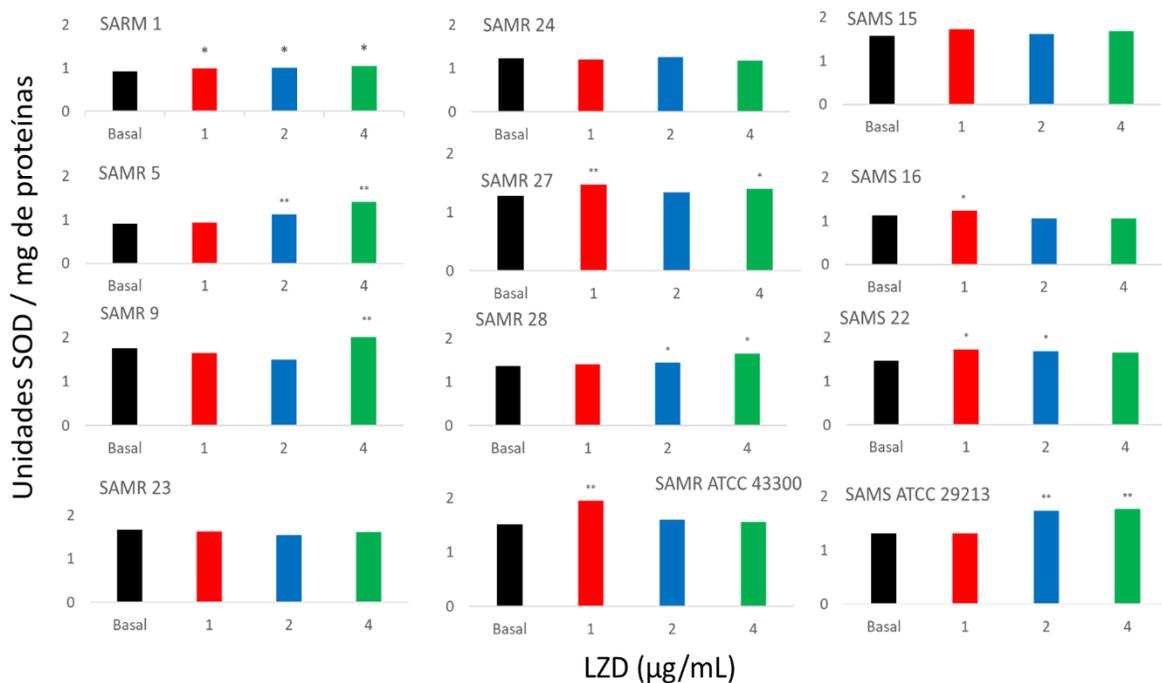


Figura 13. Cuantificación de la actividad SOD en cepas de *S. aureus*. Las barras rojas (1 µg/mL), azules (2 µg/mL) y verdes (4 µg/mL) comprenden los respectivos tratamientos con LZD (eje x). La barra negra a la izquierda de cada gráfica refleja la respuesta basal de la cepa. En el eje vertical (y) se cuantifica las unidades SOD/mg de proteínas. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$ significancia respecto del control sin antibiótico (basal).

El biomarcador de estrés oxidativo, AOPP, se evaluó para constatar la factibilidad del daño generado por ERO y ERN en las cepas seleccionadas, e identificar si tenía relación con la actividad inhibitoria de LZD. Las cepas se expusieron a LZD y se estudió la evolución de la lesión oxidativa en el tiempo. Los resultados obtenidos no revelaron un incremento de los niveles de AOPP, inclusive hasta las 24 h de incubación, a la vez que no se advirtió cambio en los tratamientos con LZD. Soló las

cepas SAMR 1 y SAMR 27 presentaron un incremento del 15% respecto de los valores basales, a las 24 h de incubación con el antibiótico.

Los resultados obtenidos demostraron que en las cepas donde se vislumbró producción de ERO y ERN no se observó un aumento de la capacidad antioxidante total para contrarrestar este efecto oxidante. Asimismo, tampoco se identificó una inducción marcada de la enzima SOD respecto del control sin tratar. Además, la producción de especies reactivas no presentó un daño significativo en las proteínas bacterianas. Los efectos se observaron en períodos de tiempo puntuales para cada cepa y los resultados no fueron acumulativos en el tiempo.

Los antibióticos inhiben diferentes procesos celulares en los microorganismos, en estos se consume energía celular, sugiriendo que el tratamiento antimicrobiano presenta consecuencias relevantes sobre el metabolismo bacteriano. Lobritz y col. (2015) lograron detectar, por metabolómica, la acumulación de subproductos derivados de la inhibición celular causada por antibióticos bacteriostáticos en cepas de *S. aureus* tales como: LZD, clindamicina, cloranfenicol y eritromicina; identificando la acumulación de metabolitos. La inhibición de la síntesis proteica (es decir, transcripción o traducción) se asoció con una disminución de la respiración celular bacteriana. Asimismo, en respuesta al bloqueo se observó una acumulación de aminoácidos y nucleótidos, reflejando la incorporación reducida de péptidos o ARN. Los análisis metabolómicos y proteómicos de los tratamientos con antibióticos bacteriostáticos han sugerido que el metabolismo central se suprime en respuesta al tratamiento (Zhang, 2014) reduciendo la demanda de energía, y secundariamente, suprimiendo las tasas de respiración celular y producción de ATP (Koebman y col., 2002). Lin y col., (2014) demostraron que la exposición de *E. coli* a clortetraciclina (antibiótico bacteriostático) provoca una regulación negativa de las principales vías metabólicas y en consecuencia, se reduce el consumo de energía en la célula.

En contraste a la respuesta bacteriostática, la evidencia sugiere que las drogas bactericidas pueden aumentar las tasas metabólicas celulares y que la eficacia antibiótica puede relacionarse directamente con el estado metabólico (Ritterhaus y col., 2013). La respuesta transcripcional a los antibióticos bactericidas implica la regulación positiva de los genes implicados en el metabolismo central y la respiración celular (Dwyer y col., 2007; Kohanski y col., 2007, 2008).

La síntesis de proteínas es el proceso donde se consume mayor energía dentro del metabolismo global de la célula (Schneider y col., 2002; Wilson, 2014). En consecuencia, la interrupción de este proceso celular puede causar cambios significativos en la dinámica del consumo de la energía celular. Teniendo en cuenta los antecedentes citados, los resultados obtenidos en este apartado se podrían atribuir a que el bloqueo de la síntesis proteica originada por el tratamiento con LZD provoca una desaceleración de la respiración celular que conlleva a una disminución de la

actividad metabólica tanto en células planctónicas como lo observado en biofilm. De esta manera, la célula ingresaría a un estado durmiente en el cual la inducción de estrés oxidativo podría depender del estado metabólico de cada célula al momento del tratamiento. Debido a esto, no se aprecia aumento de biomarcadores vinculados al estrés, así como tampoco inducción de un sistema de defensa ni aumento de la capacidad antioxidante total de la célula.

1.2.4 Investigación de la toxicidad de LZD en células sanguíneas: Hemólisis e inducción de estrés oxidativo en Leucocitos

Como parte del estudio del daño inducido por LZD, se procedió a determinar la toxicidad provocada por el antibiótico en células sanguíneas y se evaluó el porcentaje de hemólisis luego de la incubación con el antibiótico. En todas las condiciones ensayadas no se observó hemólisis significativa respecto del control, inclusive a concentraciones utilizadas en tratamientos clínicos (10xCIM).

Asimismo, se cuantificó la producción de ERO y ERN en glóbulos blancos (GB) monitoreando la intensidad de fluorescencia proveniente de la oxidación de la sonda DHR. Las muestras sin previa incubación con LZD no manifestaron cambio significativo de la intensidad de fluorescencia a las diferentes concentraciones ensayadas (Figura 14). Sin embargo, cuando se incubaron por 20 min, se apreció el máximo incremento de la intensidad emitida a concentraciones sub-CIM. En contraste, a los 40 min de exposición se observó que la producción de especies reactivas fue inferior a lo detectado a un tiempo menor y el porcentaje máximo de aumento fue de 59,6% a la concentración sub-CIM de 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 11,01% a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respecto del control.

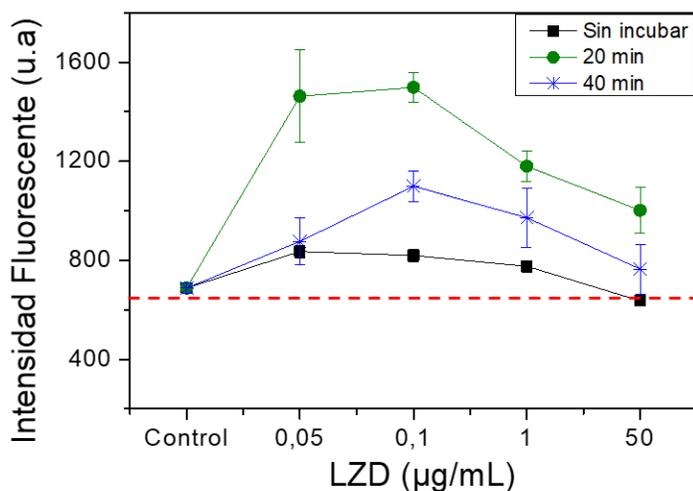


Figura 14. Cuantificación de la producción de especies reactivas en glóbulos blancos. La gráfica exhibe el control y los tratamientos con LZD a diferentes concentraciones y en distintos tiempos.

Algunos antibióticos disponibles para tratamientos clínicos provocan alteraciones en células sanguíneas, uno de los más estudiados es cloranfenicol (antibiótico bacteriostático). El efecto adverso más severo es la depresión de la médula ósea, que conduce a una anemia aplásica irreversible (Yunis, 1973). Páez y col. (2008) demostraron la asociación del incremento de ERO en GB obtenidos de pacientes sanos, este efecto se vio acoplado al aumento de la actividad de las enzimas SOD, catalasa (CAT) y diaforasa, utilizadas como marcadores en respuesta al estrés oxidativo generado.

Wang y col., (2014) determinaron alteraciones de parámetros hematológicos en ratas tratadas con dosis orales de LZD por un período de 14 días. Los resultados revelaron una disminución del número de GB, hematíes y plaquetas, mientras que las actividades enzimáticas de SOD y CAT exhibieron ser dosis-dependiente. En el mismo estudio se destacó un aumento del marcador malondialdehído (MDA) y del contenido de óxido nítrico. El efecto fue reversible tras la administración de un antioxidante como la vitamina E. Mientras que los resultados obtenidos en GB y hematíes, en este trabajo de tesis, demuestran sólo una inducción de especies reactivas a tiempos cortos y a concentraciones bajas de LZD.

Wang y col. (2015), presentaron evidencia de alteraciones hematológicas en pacientes luego de 20 días de tratamiento con LZD. Las investigaciones revelaron un incremento en los niveles de ERO, MDA, SOD y CAT, y así, correlacionaron el papel clave del estrés oxidativo en el mecanismo de iniciación y progresión de la trombocitopenia a causa de la exposición a LZD. En consecuencia, se podría vincular el estrés oxidativo generado por LZD, a la exposición por tiempos prolongados y elevadas concentraciones del antimicrobiano en estudios *in vivo*. Los menores resultados obtenidos en este trabajo podrían estar relacionados a que en experimentos *in vitro* no se puede evidenciar los parámetros que influyen en ensayos *in vivo*, así como también limitaciones en la metodología como concentraciones del antibiótico elevadas (precipitación) y tiempos de incubación con las células sanguíneas. Cabe destacar, que, en las terapias anti-infecciosas, la activación de las especies de oxígeno ha sido sugerida como uno de los factores de defensa frente al medio ambiente interno (Beck y col., 2000), por lo que la formación de ERO está estrechamente relacionada con la activación y la agregación plaquetaria (Freedman, 2008).

De la totalidad de cepas utilizadas, sólo el 40% mostró inducción de especies de oxígeno y nitrógeno nocivas (Figura 15). Sin embargo, este efecto fue aleatorio y no se identificó relación con las características genéticas de las cepas evaluadas, lo que sugiere que el estrés observado podría asociarse al estado metabólico de cada cepa durante el tratamiento. De los datos obtenidos, se dilucidó que el estrés oxidativo en bacterias no tiene un rol preponderante ligado a la acción inhibitoria de LZD, motivo por el cual, marcadores de estrés oxidativo y sistemas de defensa antioxidantes no presentaron modificaciones significativas.

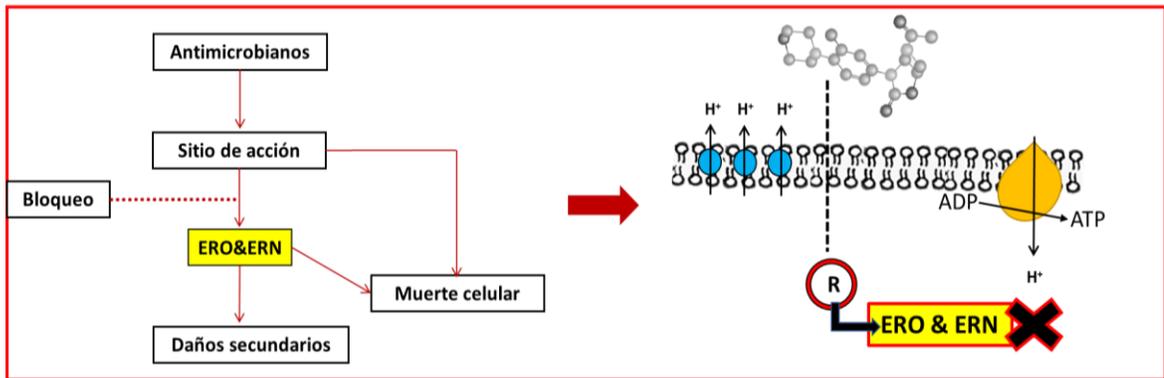
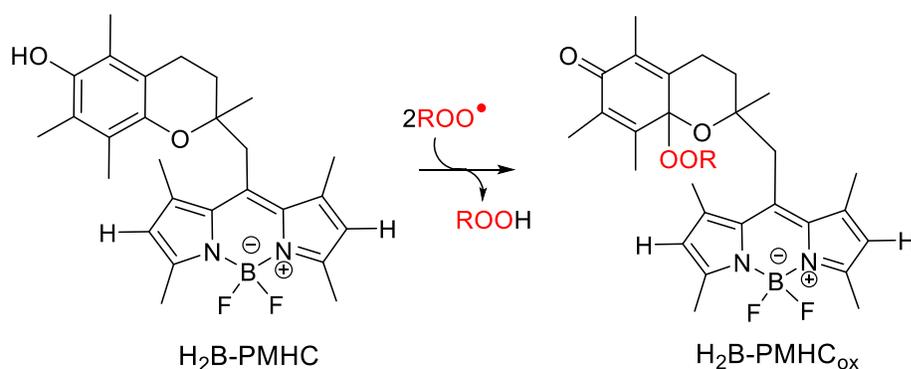


Figura 15. Esquema del modelo propuesto donde un antimicrobiano presenta un mecanismo de acción descrito que inducirá especies reactivas como parte de un proceso secundario que conduce a daños celulares con el desencadenante de la muerte celular. El antibiótico bacteriostático LZD bloquea la subunidad ribosomal (R), lo cual no se observa la producción de ERO y ERN como parte de su acción inhibitoria en cepas de *S. aureus*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: PARTE II

Comprender el impacto fisiológico que presentan los compuestos bactericidas ha sido un desafío de nuestro grupo de investigación. Estudios previos realizados con el antibiótico bactericida ciprofloxacina (CIP) demostraron la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) tóxicas en diferentes géneros bacterianos. Por este motivo, se seleccionó esta fluorquinolona para dar continuidad con el segundo objetivo específico de esta tesis y así estudiar uno de los eventos oxidativos más relevantes para la célula asociado a la muerte celular inducida por ERO como es la peroxidación lipídica (PL). Proyectamos los estudios en suspensiones de cultivos planctónicos como también a nivel de célula individual por microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF).

Se realizó un trabajo en colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Prof. Dr. Gonzalo Cosa de la Universidad de McGill, Montreal, Canadá. Para lograr evaluar el daño oxidativo en membranas lipídicas con una alta especificidad, y resolución espacio-temporal, se trabajó con la sonda fluorescente desarrollada y caracterizada por el grupo de investigación del Prof. Dr. Gonzalo Cosa (Krumova y col., 2012) en combinación con técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia. El colorante H₂B-PMHC está diseñado en base a la química del compuesto α -tocoferol, un potente antioxidante lipídico, de manera que reacciona rápidamente con los radicales peroxilos de las membranas lipídicas, donde una molécula de la sonda en estado reducido (cromanol-BODIPY, no emisora) es oxidada por dos radicales generándose la especie fluorescente (cromanona-BODIPY, emisora, H₂B-PMHC_{ox}, Esquema 1).



Esquema 1. Oxidación del colorante H₂B-PMHC en presencia de radicales peroxilo lipídicos.

El objetivo de nuestro trabajo aquí descrito fue evaluar mediante la utilización del colorante H₂B-PMHC la lesión oxidativa provocada en lípidos por el tratamiento con el antibiótico CIP. Además, encauzar los estudios a nivel de células únicas para monitorear los cambios fisiológicos inducidos por una perturbación exógena célula a célula, y describir una nueva metodología con un gran potencial para el estudio de la PL en tiempo real.

2.1 Identificación del daño oxidativo inducidos por CIP en diferentes géneros bacterianos

La PL es una lesión oxidativa que sufren las células bajo condiciones basales aeróbicas, como así también, producto de la exposición a diversos agentes oxidantes y compuestos bactericidas. La primera etapa de este trabajo abordó el estudio de la perturbación ocasionada por el antibiótico bactericida CIP en diferentes géneros bacterianos mediante seguimiento de la oxidación del colorante H₂B-PMHC. Se seleccionaron 6 cepas, 3 Gram positivas (Figura 16, columna derecha) de referencia: *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (SAMS), *S. aureus* meticilino resistente ATCC 43300 (SAMR); y 3 Gram negativas (Figura 16, columna izquierda): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y una cepa clínica de *P. aeruginosa* provista por el hospital Aconcagua de la ciudad de Córdoba (Argentina), la cual fue designada como H. Las 6 cepas seleccionadas fueron susceptibles a CIP y las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) fueron entre 0,25 y 1 µg/mL.

En primer lugar, se investigó la intensidad fluorescente emitida cuando las cepas se trataron con concentraciones crecientes del antibiótico por un lapso de 12 h (Figura 16). Las cepas SAMS y SAMR, presentaron una intensidad fluorescente semejante al control no tratado con CIP (Figura 16 E y F). *B. subtilis* reveló una intensidad fluorescente superior al control, a la concentración de 30 µM, sin embargo, esta diferencia no fue significativa.

Las cepas Gram negativas (Figura 16, columna izquierda) tuvieron una performance basal diferente a las Gram positivas, la lesión oxidativa observada fue superior a SAMS y SAMR, mientras que fue comparable a *B. subtilis* (Figura 16 D). En el caso de *P. aeruginosa* ATCC 27853, la intensidad fluorescente emitida en los tratamientos fue similar al control (Figura 16 A). En contraste, la cepa clínica de *P. aeruginosa* H presentó una lesión oxidativa superior a la cepa de referencia (Figura 16 B). Por su parte, *E. coli* reveló un daño oxidativo dosis-dependiente, el incremento de la intensidad fluorescente normalizada fue más del doble, cuando se expuso a la concentración de 100 µM de CIP, respecto de su control no tratado (Figura 16 C).

La respuesta heterogénea observada entre ambos grupos, Gram positivas y negativas se asoció, principalmente, a las diferencias que presentan las paredes celulares. La estructura de la pared de las bacterias Gram positivas está compuesta por una delgada membrana lipídica rodeada por una capa de mureína (copolímero formado por 2 azúcares) y ácidos lipoteicoicos. En contraste, las Gram negativas presentan una pared constituida por dos membranas lipídicas, una membrana interna y otra externa separadas por una delgada capa de mureína (Raetz y Whitfield, 2002; Brown y col., 2015).

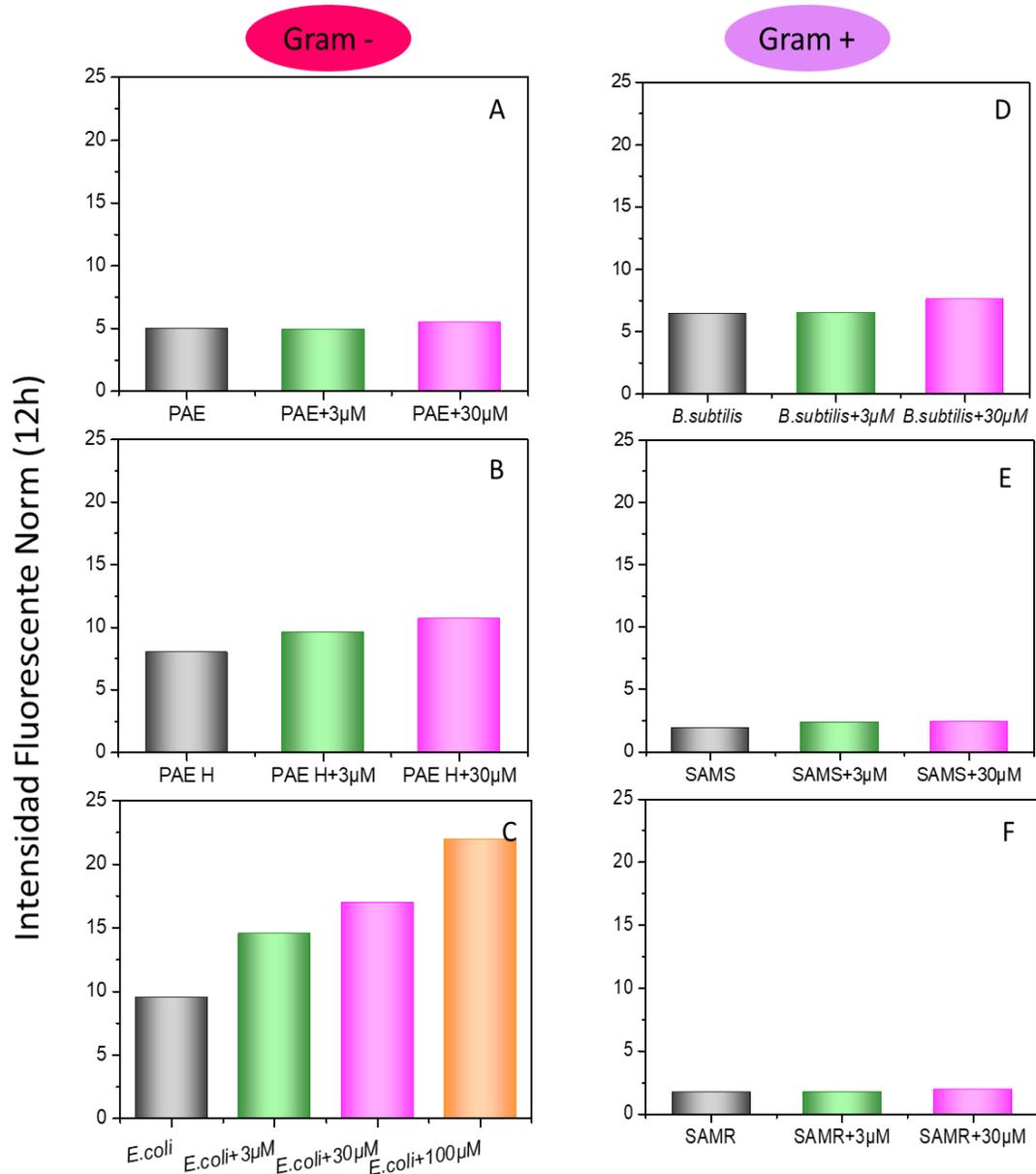


Figura 16. Intensidad fluorescente obtenida del tratamiento por 12 h con diferentes concentraciones de CIP, y control sin tratar (barra negra). En la Figura se destaca en el panel izquierdo *P. aeruginosa* ATCC 27853 (A), *P. aeruginosa* H (B), *E. coli* ATCC 25922 (C). El panel derecho refleja los resultados con *B. subtilis* ATCC 6051 (D), SAMS ATCC 29213 y SAMR ATCC 43300.

En ambos casos, la composición de la membrana lipídica, mayoritariamente, es la siguiente: Fosfatidiletanolamina (PE), Fosfatidilglicerol (PG) y Cardiolipina (CL). Asimismo, se ha descrito que dentro de un mismo género bacteriano la composición lipídica puede variar entre cepas (Zang y Rock, 2008), en base a este antecedente atribuimos las diferencias observadas entre las cepas de *P. aeruginosa* clínica y de referencia.

Uno de los modelos de membranas biológicas más ampliamente estudiadas es el de la *E. coli*, está constituida en un 75 % por PE, un 20 % de PG y CL (Raetz y Dowhan, 1990). Tanto *P. aeruginosa* como *B. subtilis* presentan los 3 fosfolípidos mencionados para *E. coli*, en diferentes proporciones, y otras combinaciones de lípidos, mientras que *S. aureus* no presenta PE en su estructura (Sohlenkamp y Geiger, 2016).

Informes previos revelaron que los ácidos grasos totales en cepas de *S. aureus* sensibles y resistentes a meticilina son similares tanto cualitativa como cuantitativamente (Dunnick y O'Leary, 1970), lo cual puede asociarse a la semejanza en el efecto observado entre las cepas SAMS y SAMR. Por otro lado, se ha descrito que *B. subtilis* tiene similitudes estructurales en la composición y concentración de lípidos a la pared de *E. coli* (Silhavy y col., 2010), por lo que difiere con el resto de las cepas Gram positivas.

2.2 Determinación de la viabilidad celular pre y post tratamiento con CIP utilizando IP como marcador

La generación de ERO es un subproceso en el tratamiento con antibióticos bactericidas. Sin embargo, para que estas especies se produzcan, la célula debe estar metabólicamente activa (Belenky y col., 2015). El colorante IP, se utilizó para marcar las células muertas pre y post tratamiento con CIP y de esta manera tener información sobre el número de células individuales no viables en cada tratamiento. El número total de células por experimento se registró a través del canal de diferencial de contraste (DIC) y, en base a este, se calculó el porcentaje de la población que se tiñó con IP. En condiciones basales se registró un total de 6,4% de células muertas luego de las 12 h de exposición. *E. coli* tratada con CIP 30 μ M y 100 μ M revelaron un 35,1 y 45,4% de bacilos muertos, posterior al tiempo de incubación con CIP, respectivamente (Figura 17).

Estudios previos llevados a cabo con CIP evidenciaron que el antibiótico no altera la integridad de la membrana, aún a elevadas concentraciones del mismo (Wickens y col., 2000; Silva y col., 2011). Por lo tanto, los bacilos marcados con IP muestran un evento letal. Esta aproximación permitió reforzar el hecho de que los

experimentos realizados con H₂B-PMHC arrojan información sobre la evolución de PL en tiempo real, ya que sólo aquellas células que se encuentren metabólicamente activas son capaces de producir ERO.

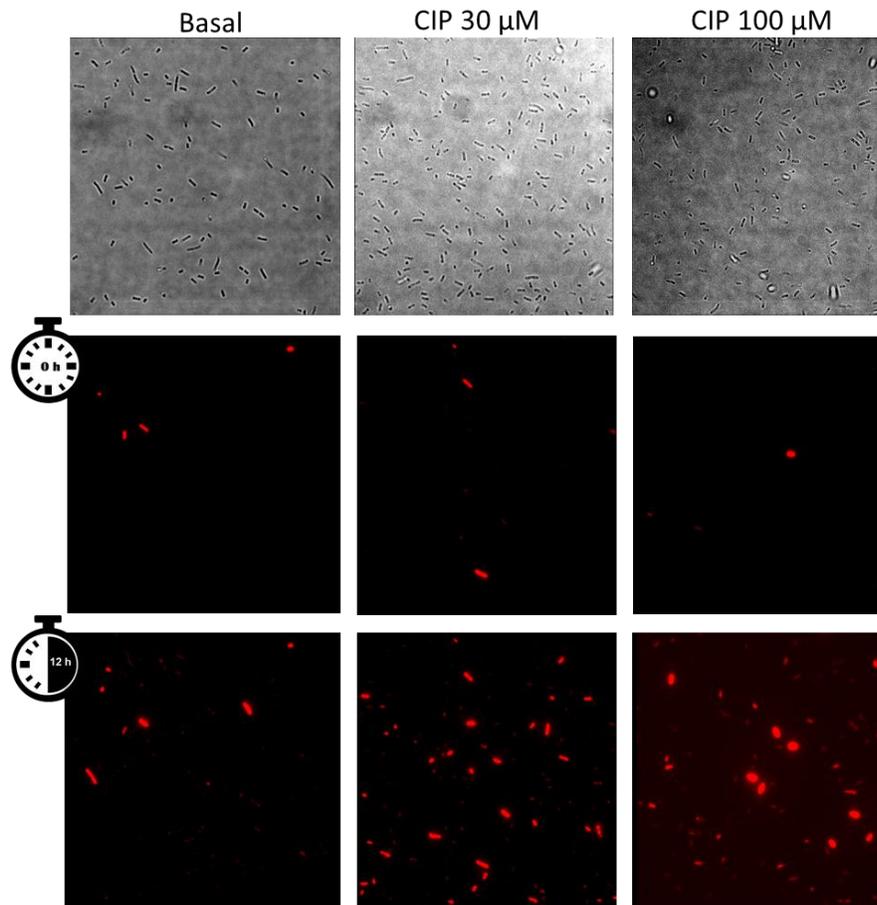


Figura 17. Imágenes de DIC de *E. coli* (fila superior). La columna izquierda representa las células en condiciones basales, la sucesiva indica la exposición de la cepa a 30 μM de CIP y la columna derecha el tratamiento con 100 μM del antibiótico. La segunda fila refleja la cantidad de células muertas al inicio del tratamiento (tiempo 0), y la tercera fila a las 12 h.

2.3.1 Estudio de la lesión oxidativa, en tiempo real, provocada por CIP en *E. coli*

En vista de comprender, a nivel de células individuales, los cambios fisiológicos que provoca un antibiótico de amplio espectro, CIP, se procedió al análisis en tiempo real de la PL. Para los estudios de capturas de imágenes en el tiempo, se utilizó la cepa *E. coli*, ya que esta presentó un efecto dosis-dependiente identificado previamente por fluorescencia en suspensión bacteriana cuando se expuso a CIP (Figura 16).

La Figura 18 representa las diferencias de intensidades individuales de fluorescencia en cada bacilo a tiempo 0, 6 y 12 h. En la fila superior de la Figura 18 (tiempo cero), se destacó una mayor cantidad de células que presentaron un estado de estrés oxidativo avanzado cuando fueron tratadas con CIP 30 y 100 μM . Por su parte en el basal (control) se apreció una fluorescencia débil proveniente de unas pocas células.

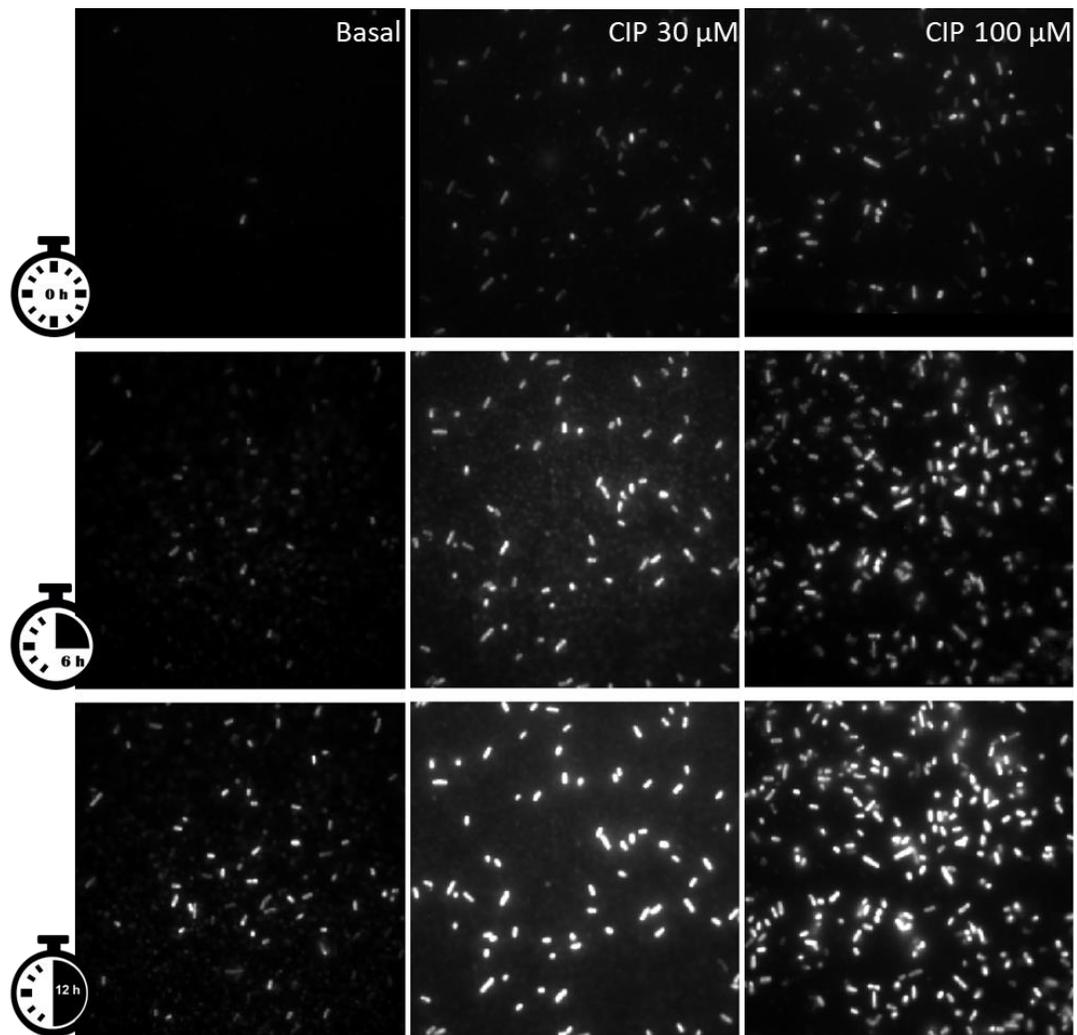


Figura 18. Imágenes de las poblaciones de células individuales de *E. coli*, en condición basal o tratadas con CIP a las concentraciones de 30 y 100 μM . También, se indica el tiempo al cual ha sido adquirida la imagen: tiempo cero (primera fila), luego de 6 h de seguimiento (segunda fila) y posterior a 12 h de exposición (tercera fila).

A las 6 h de incubación con el antibiótico se observó un aumento de la cantidad de bacilos iluminados, mientras que aquellos que habían presentado una marcada fluorescencia desde el inicio continuaron manteniéndose brillantes e incrementaron débilmente su intensidad. En condiciones basales (bacteria sin tratamiento, columna

izquierda), se logró corroborar, en tiempo real, la producción de especies reactivas nocivas inductoras de PL, un evento de auto-oxidación inherente al metabolismo celular (Figura 18, segunda fila). Sin embargo, la PL aumentó considerablemente a las 12 h de exposición de *E. coli* con CIP (Figura 18, tercera fila). Además, se identificó un efecto de tipo dosis dependiente, ya que a concentraciones elevadas del antibiótico tanto la intensidad inicial como final de fluorescencia se vio magnificada (Figura 18 columna central y derecha).

Los histogramas de la Figura 19 muestran las intensidades de fluorescencia iniciales y finales para la cepa en condiciones basales y tratada con CIP (3, 30 y 100 μM) por 12 h. El panel de la derecha por otra parte permite correlacionar las intensidades de fluorescencia finales con relación a las iniciales para cada condición estudiada y cada bacilo observado. Aquí, cada punto representa un bacilo individual, en el que se encuentra implícita la trayectoria de incremento de fluorescencia para cada célula. El panel A muestra la oxidación basal de *E. coli*, en la que se apreciaron intensidades iniciales homogéneas en toda la población (silueta del histograma sin color) mientras que, al cabo de 12 h, las intensidades individuales se modificaron en el rango entre 1×10^4 y 2×10^4 unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a). En el panel B, se exhibe el tratamiento con 3 μM de CIP (concentración correspondiente a la CIM), en el que se demostró un comportamiento similar a lo observado en condiciones basales y sólo algunas células individuales alcanzaron intensidades finales de 3×10^4 u.a. Este fenómeno se aprecia en detalle en el gráfico de dispersión de intensidades (panel B derecha). Los bacilos tratados a la concentración de 10xCIM (30 μM , panel C izquierdo) presentaron intensidades iniciales comparables al control, mientras que luego de 12 h se registró una mayor diversidad de intensidades finales en la población, comparada con la población no tratada. Estas variaciones revelaron eventos de oxidación diferentes a lo largo de un cultivo proveniente de una única colonia aislada. Cuando el sistema se sometió a una concentración extrema de CIP, el comportamiento de la población a tiempo cero, se vio perturbado mostrando células con intensidades iniciales de hasta $2,5 \times 10^4$. En este caso, se apreció una variedad notable de intensidades iniciales, lo que podría asociarse a un aumento del metabolismo de las células individuales (panel D derecha). Cabe destacar que las intensidades iniciales en todos los casos comenzaron a registrarse luego de 5 min después de agregar el antibiótico. Es importante destacar que a las concentraciones de 30 y 100 μM de CIP, las intensidades finales fueron en el rango entre 2×10^4 y 5×10^4 . Tanto las células tratadas con CIP como el comportamiento basal de las mismas, revelaron intensidades de fluorescencia, mayoritariamente homogéneas a concentraciones (3 y 30 μM), a tiempo cero. Sin embargo, las trayectorias de incremento de intensidades fueron únicas para cada bacilo y generaron la dispersión de valores a tiempo final (12h) observada en la Figura 19.

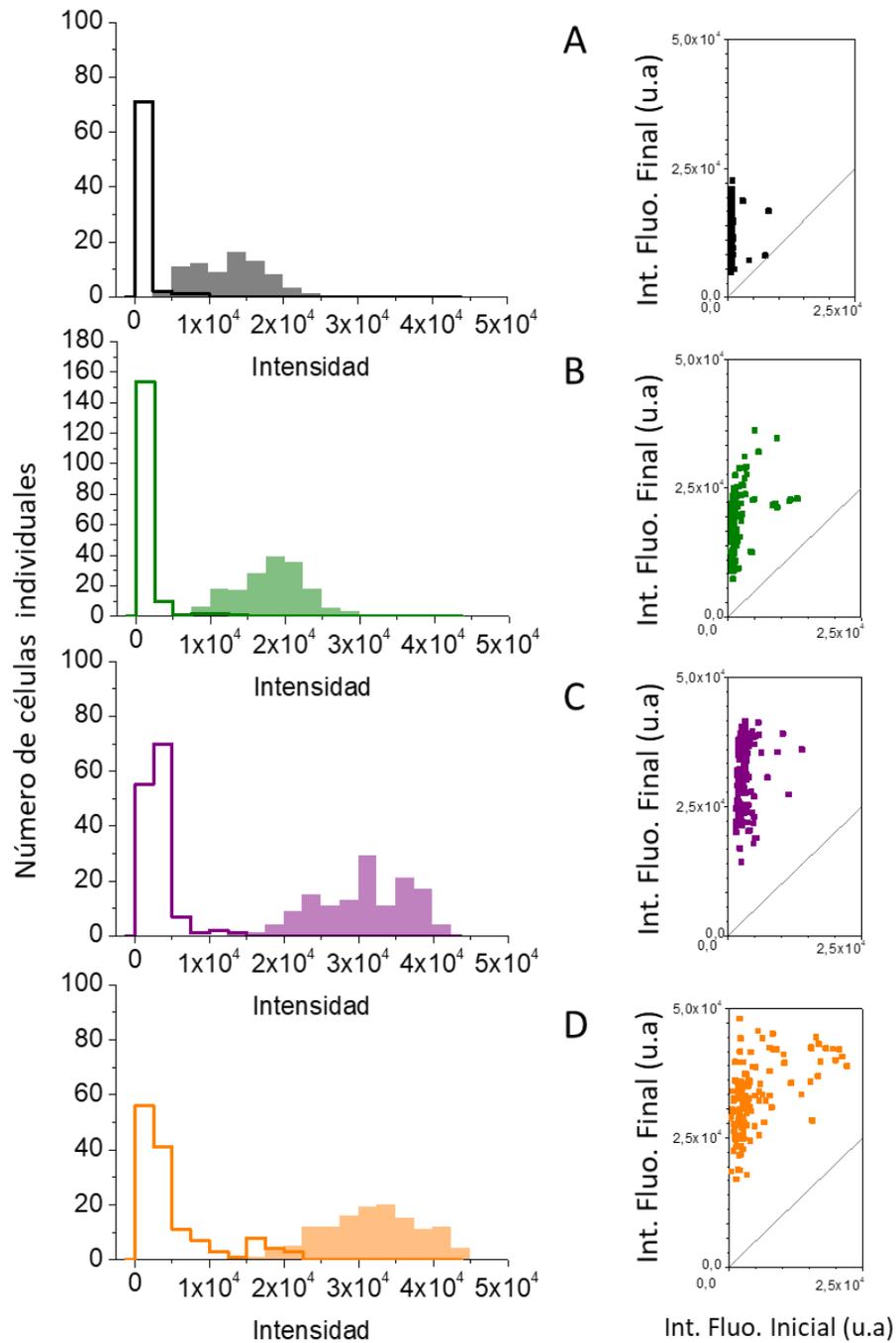


Figura 19. Histogramas de distribución de intensidades de fluorescencia a tiempo cero (histograma sin rellenar), y luego de 12 h (histograma relleno) de seguimiento en función del número de células individuales en el experimento. A la derecha de cada histograma se exhibe la correlación de intensidades finales vs. iniciales para cada condición estudiada. El panel A representa la lesión oxidativa basal de *E. coli*. Los paneles B, C y D exhiben los tratamientos con 3 μM , 30 μM y 100 μM de CIP, respectivamente.

Consecuentemente, mientras que la dispersión de valores de intensidad es mínima a tiempo cero y grande después de 12 h, la correlación de intensidades

iniciales y finales demostró un comportamiento lineal de pendiente infinita donde la intensidad final (eje y) es independiente de la intensidad inicial (eje x). Solo en el caso de tratamientos con 100 μM de CIP es factible observar que un número de bacterias exhibe alta intensidad de fluorescencia inicial, y similar intensidad al final, con lo que la correlación toma una pendiente de uno para estos bacilos.

Para optimizar la visualización de la evolución de la PL, las Figuras 20, 21 y 22 muestran el progresivo daño oxidativo en el tiempo (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h). Dada una “tira de película o *filmtrip*” que consiste en siete marcos adquiridos a tiempos determinados, se le acopló la trayectoria fluorescente (resultante de todos los marcos) que presentó la célula individual, seleccionada al azar. En general, la respuesta basal de las células presentó una tendencia de aumento de la intensidad de fluorescencia homogénea (Figura 19A y Figura 20). La cepa tratada con CIP 3 μM (concentración correspondiente a la CIM) exhibió un aumento de la intensidad fluorescente a partir de las 6 h de tratamiento (Figura 20), permitiendo asociar la PL inducida como un proceso que se prolonga en el tiempo por el incremento del desequilibrio oxidativo en la célula.

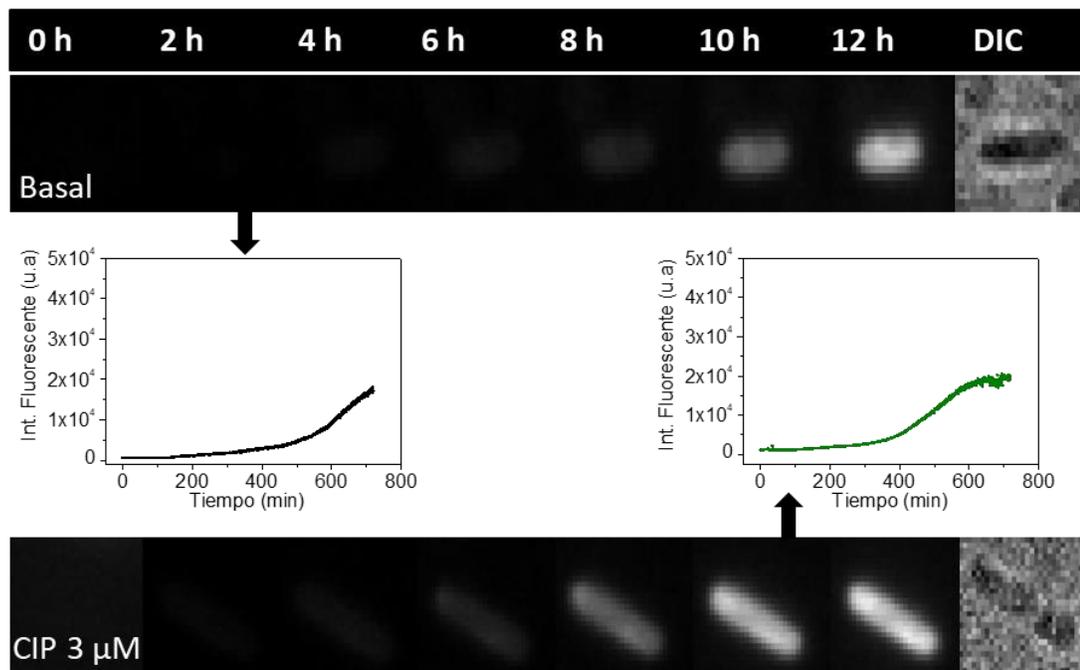


Figura 20. Imágenes del comportamiento de células individuales en el tiempo. Para cada *filmtrip* se detalla el incremento de la intensidad de fluorescencia a lo largo del experimento. En este se representa una célula sin tratar (superior) y otro bacilo tratado con CIP 3 μM .

La Figura 21 revela los resultados alcanzados, cuando *E. coli* se incubó con el antibiótico a la concentración de 10xCIM. Cabe destacar que esta concentración es de gran relevancia, ya que es la empleada en tratamientos clínicos. En la tira de película superior de la Figura 21, se ejemplifica una célula brillante desde tiempo cero, con un

incremento de la intensidad fluorescente normalizada de 3,9 veces respecto de su intensidad inicial. La mayor parte de las células de la población analizada expuesta a 30 μM de CIP, por el contrario, comenzaron a incrementar su intensidad luego de 4 h de tratamiento. La Figura 21, panel inferior ilustra el comportamiento característico de un bacilo donde se proyectó a las 12 h un incremento de la intensidad normalizada de 32,8. La heterogeneidad en el comportamiento temporal exhibido de bacilo a bacilo en cuanto a la PL en respuesta a la presencia de CIP podría indicar distintos estadios metabólicos de las células dentro de una misma población. Es importante remarcar que, en ambos casos, se distinguió, dentro de cada célula, una distribución fluorescente heterogénea, con intensidades superiores en los polos.

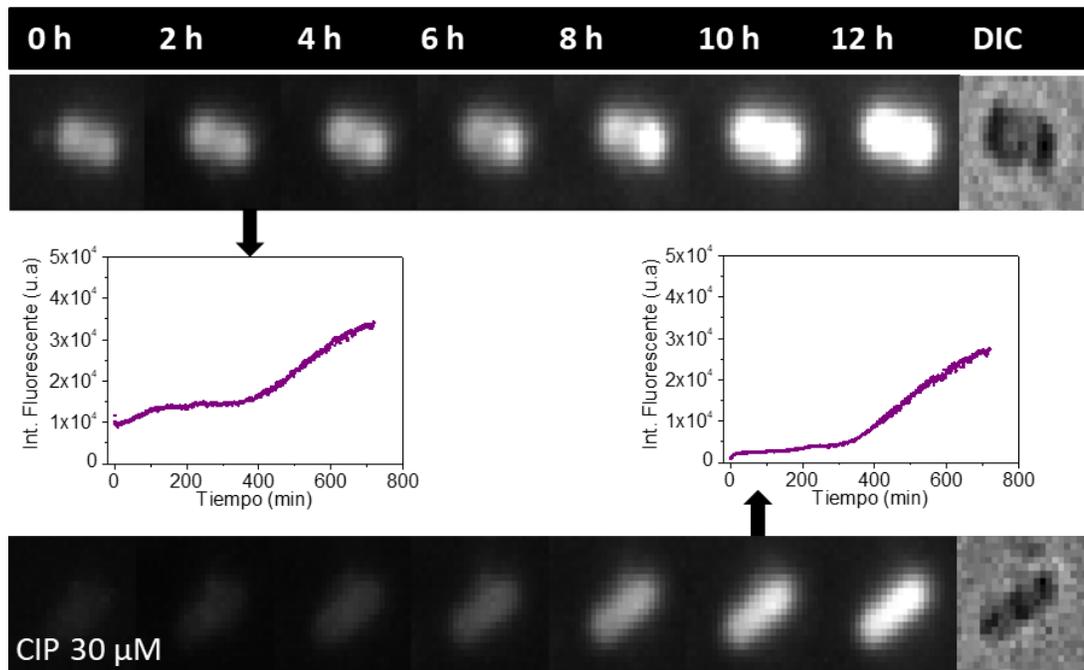


Figura 21. Imágenes de la respuesta de dos células individuales, cuando se incubaron con CIP 30 μM .

La máxima concentración probada de CIP (Figura 22) presentó un patrón de comportamiento altamente diverso, con células muy brillantes desde el inicio, otras que fueron incrementando su intensidad paulatinamente a medida que avanzó el deterioro oxidativo, y otra población que se iluminó durante el último período (entre las 10 y 12 h) del experimento. Las tiras de película, representativas de la población, evidenciaron una distribución de la intensidad de fluorescencia superior en los polos de las células como ya se había observado en el tratamiento de 30 μM de CIP; este comportamiento se vislumbró en gran parte de las poblaciones estudiadas.

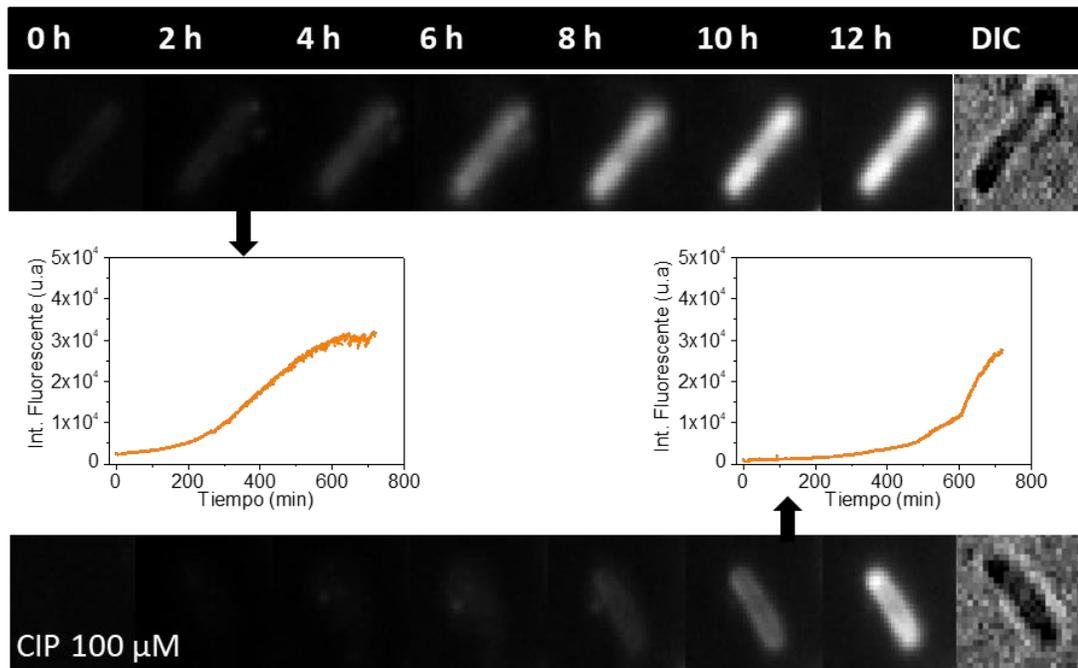


Figura 22. Imágenes de la evolución del daño oxidativo en *E. coli* tratada con una concentración extrema de CIP de 100 μM .

Por su parte, las trayectorias de las células mostraron en la mayoría de los casos una curva de tipo sigmoide. Esto permitió identificar que salvo aquellas células que se encontraban iluminadas desde el inicio del experimento (tiempo 0), todas presentan un periodo de inducción donde la fluorescencia casi no se percibe y que luego de un punto crítico comienza a incrementarse con mayor velocidad la intensidad de fluorescencia. Estas observaciones se asociaron con el incremento de radicales peroxilo que se exagera y conduce a una situación de estrés oxidativo catastrófica para la célula, probablemente comprometiendo su integridad desde ese quiebre e induciendo su muerte.

En estudios en suspensiones de cultivos planctónicos, uno de los productos no deseados que se generan como consecuencia de la respiración aeróbica y la fosforilación oxidativa es la producción de anión superóxido seguido de radicales tóxicos (Imlay y Fridovich, 1991). Se ha descrito que el anión superóxido representa una amenaza directa para las proteínas que contienen complejos de Fe-S, ya que los oxidan fácilmente (Liochev y Fridovich, 1999; Imlay, 2003, 2006). De manera que, esta especie descompone los complejos mencionados liberando concentraciones elevadas de Fe^{2+} (Keyer e Imlay, 1996) que posteriormente median la formación de radical hidroxilo por la reacción de Fenton. Además, se producen otros intermediarios reactivos tóxicos que tienen como blanco el daño de macromoléculas como ADN, proteínas y lípidos (Aruoma y col., 1989; McBride y col., 1991; Balasubramanian y col.,

1998; Nunoshiba y col., 1999; Touati, 2000; Imlay, 2003; Ma y col., 2015). Kohanski y colaboradores (2007) aportaron evidencia sobre la producción de radical hidroxilo posterior al tratamiento con antibióticos bactericidas. Los estudios sugieren que diferentes cambios bioquímicos se producen luego de una dosis letal de estos fármacos, lo que promueve la formación de ERO. De esta manera, la producción de especies reactivas causadas por la exposición a norfloxacin se constató por cambios en la expresión génica y análisis fenotípicos en la bacteria *E. coli*. Dwyer y col. (2007) demostraron que la generación de radical hidroxilo y anión superóxido se generan luego de la interacción antibiótico-target.

Por otro lado, la eficacia de la terapia antimicrobiana se ha asociado al flujo de carbono del ciclo de los ácidos carboxílicos (TCA) y a factores ambientales, como la disponibilidad de oxígeno molecular presente en el sistema para alimentar el transporte de electrones (Thomas y col., 2013; Rosato y col., 2014). Lobritz y col. (2015) explicaron que post interacción antibiótico-target se produce una perturbación en la respiración celular que conlleva a un aumento en las tasas de consumo de oxígeno en el caso de antibióticos bactericidas como norfloxacin, gentamicina y ampicilina, donde la respiración celular se ve exacerbada o acelerada. En el mismo trabajo, destacan que aquellas bacterias en las cuales se realizó un bloqueo del sistema citocromo oxidasa no produjeron, post tratamiento con norfloxacin, un incremento de la respiración celular y como tal se identificó un aumento en la supervivencia esas células. En condiciones aerobias, *E. coli* sintetiza ATP mediante el intercambio eficiente de electrones a través de la cadena de transporte de electrones (Bettenbrock y col., 2014). Estudios de bloqueo de genes de citocromos de la cadena de transporte de electrones, en presencia de antibióticos, han demostrado que la tasa de muerte celular se ve disminuida, lo que indica que la respiración presenta un rol preponderante en el daño celular inducido por antibióticos.

El reflejo de un estado redox exacerbado por el tratamiento con un antimicrobiano, tiene aparejado como consecuencia perturbaciones en macromoléculas. Dentro de estas alteraciones, se detallan altos niveles de proteínas oxidadas, peroxidación lipídica, oxidación de nucleótidos, formación de aductos de malondialdehído (MDA) y ruptura de la doble cadena de ADN bacteriano (Farr y Kogoma, 1991; Becerra y col., 2006; Dwyer y col., 2014). Estudios por metabolómica realizados en *E. coli* con 3 antibióticos, norfloxacin, ampicilina y gentamicina, revelaron que los cambios metabólicos inducidos en la bacteria inicialmente fueron similares con los 3 antibióticos y luego de un determinado periodo (aproximadamente luego de 60 min) la respuesta individual fue específica para cada caso (Belenky y col., 2015). Además, relacionaron a las alteraciones metabólicas inducidas por antibióticos con el daño oxidativo ocasionado en diferentes componentes celulares críticos, así como la activación de la respuesta antioxidante frente a este evento. Al mismo tiempo identificaron que las concentraciones relativas de nucleótidos y lípidos disminuyeron

con el tratamiento, mientras que se determinó un incremento considerable de las concentraciones de carbohidratos, energía y metabolitos de vitaminas y cofactores.

La quinolona CIP produce la generación de especies oxidantes que provocan un desequilibrio oxidativo, el cual puede ser identificado en tiempo real por microscopía de fluorescencia TIRF. La mayoría de los estudios realizados en bacterias tratadas con antimicrobianos se realizan en experimentos en suspensiones, como los realizados en lector de placas multipocillo y, en gran parte, por periodos cortos de tiempo (hasta 120 min). En este trabajo, logramos corroborar que el proceso de oxidación de lípidos es un efecto que es diferente para cada célula y que se prolonga en el tiempo. La peroxidación de lípidos es probablemente uno de los eventos más relevantes asociados a la muerte celular inducida por radicales libres, y los productos derivados de este proceso a su vez pueden reaccionar con el ADN y proteínas provocando modificaciones oxidativas (Yoon y col., 2002; Marnett, 2002). El MDA es un producto de la oxidación de lípidos, que puede a su vez actuar como un mutágeno endógeno y generar aductos con el ADN. Becerra y col. (2006) describieron la oxidación de lípidos en *S. aureus* asociado al incremento de ERO. Además, reportaron una disminución de la formación de aductos de MDA cuando se adicionó metionina al sistema, indicando una disminución del efecto oxidativo en presencia de un secuestrante de radicales. Sin embargo, los resultados obtenidos por el ensayo de detección de MDA no es un reflejo directo de la PL. Nuestro trabajo explora el efecto de ERO a nivel membrana lipídica adentrándose en la temática más allá de los paradigmas establecidos y reportando directamente el agente químico involucrado en el proceso, mediante la aplicación de sondas y microscopía de avanzada. A nuestro entender, el trabajo aquí reportado ilustra por primera vez la evolución de la peroxidación lipídica a nivel de células únicas. Los experimentos revelan, claramente, un escenario donde las ERO inducen una situación catastrófica en bacterias individuales, la cual podría depender del estado metabólico de cada célula individual mencionado previamente. Al momento, no existen reportes descriptos de este evento producido por ERO en el tiempo y en individuos puntuales, por lo que se propone un nuevo camino de estudio de PL por fluorescencia para comprender el impacto fisiológico que presenta un antibiótico frente a una población bacteriana.

Resulta de gran interés remarcar las diferencias que observamos entre las células individuales, ya que a bajas concentraciones del antibiótico (3 μM) la tendencia de inducción inicial de PL es similar; mientras que en condiciones de tratamiento extremas (30 y 100 μM) el fenómeno se ve exacerbado y la tendencia de la respuesta individual no sigue un patrón. Aunque en todos los casos, se visualizaron células con una marcada producción de ERO desde el inicio del tratamiento, otras células presentaron una respuesta lenta con incrementos de la intensidad de fluorescencia luego de 400 min de exposición al antibiótico. Estudios recientes, han demostrado que pueden existir múltiples subpoblaciones que sean fenotípicamente diferentes dentro

de una misma población bacteriana. Estas subpoblaciones varían en su estado fisiológico, tamaño, grado de susceptibilidad a las drogas y comportamiento metabólico (Kester y Fortune, 2014; Brauner y col., 2016; Rego y col., 2017), así como también, en la diferenciación de células resistentes, tolerantes y persistentes. En gran parte el estudio de la dinámica de crecimiento y diferenciación fenotípica de una población de la bacteria *E. coli*, se pudo realizar usando cámaras de microfluidos y monitoreando la respuesta de las células vivas por microscopía a nivel célula única (Balaban y col., 2004; Geben y Balaban, 2009). Por lo que para poder comprender en detalle la respuesta fisiológica y mecánica de una droga, la observación directa de células únicas en el microscopio se torna una técnica indispensable, ofreciendo una metodología única que arroja información esencial y precisa en tiempo real.

2.3.2 Identificación de la lesión oxidativa provocada por el tratamiento con ciprofloxacina y PMHC en *E. coli*

Los antioxidantes son sistemas de defensa presentes en las células y su rol fundamental es el de contrarrestar el desequilibrio oxidativo que puede producirse por diferentes factores endógenos o exógenos. El agregado del antioxidante PMHC (análogo del α -*tocopherol*) se realizó con el objetivo de analizar los cambios que se produjeron en la PL por el tratamiento con CIP. La Figura 23 representa los histogramas de distribución de intensidades iniciales (silueta del histograma sin rellenar) y finales (histogramas rellenos) en función del número de células de la población. A la derecha de cada panel se encuentra el gráfico de correlación de intensidades finales versus iniciales, donde se aprecia la intensidad de cada célula individual en particular. *E. coli* expuesta a CIP (paneles B, C y D) no manifestó cambios de intensidades significativas, y los valores de intensidades iniciales se mantuvieron constantes a lo largo del experimento. Mientras que *E. coli* en condiciones basales (panel A) expuesta únicamente a PMHC (10 μ M) incrementó su fluorescencia débilmente, el histograma de intensidad final se encuentra levemente desplazado hacia la derecha.

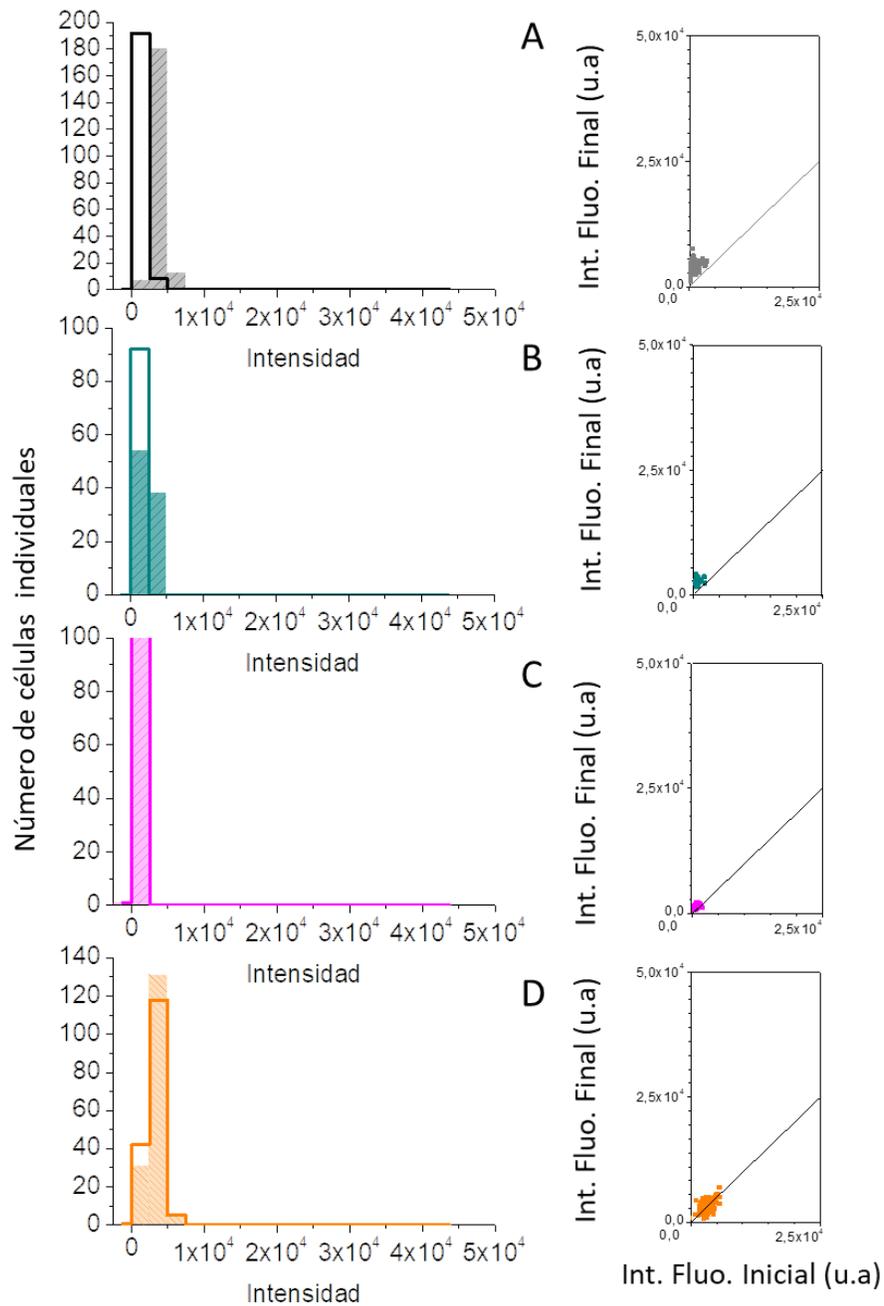


Figura 23. Histogramas de distribución de intensidades de fluorescencia a tiempo cero (histograma sin rellenar), y luego de 12 h (histograma relleno) de seguimiento en función del número de células individuales en el experimento. A la derecha de cada histograma se exhibe la correlación de intensidades finales vs. iniciales para cada condición estudiada. El panel A representa la lesión oxidativa basal de *E. coli* expuesta a PMHC 10 μ M. Los paneles B, C y D exhiben los tratamientos con 3 μ M, 30 μ M y 100 μ M de CIP más PMHC, respectivamente.

Los resultados expusieron que la adición de un antioxidante exógeno cambió el perfil de PL en todos los tratamientos con CIP respecto de lo observado en la Figura 19, incluso a concentraciones extremas. Esto podría estar vinculado a un bloqueo de la generación de ERO por la presencia del antimicrobiano debido al agregado de un antioxidante, así como al mismo tiempo incrementarse la supervivencia de las células. Además, se constató la inhibición mediante la determinación de la CIM. La Figura 24 ilustra el resultado obtenido con la adición de una concentración de 10 μM de PMHC a la suspensión bacteriana. Los resultados obtenidos revelaron que la adición del antioxidante PMHC modificó el valor de CIM de CIP, de tal manera que no se apreció efecto inhibitorio. Además, se observó inhibición del crecimiento a las concentraciones de 30 y 100 μM con del agregado de PMHC.

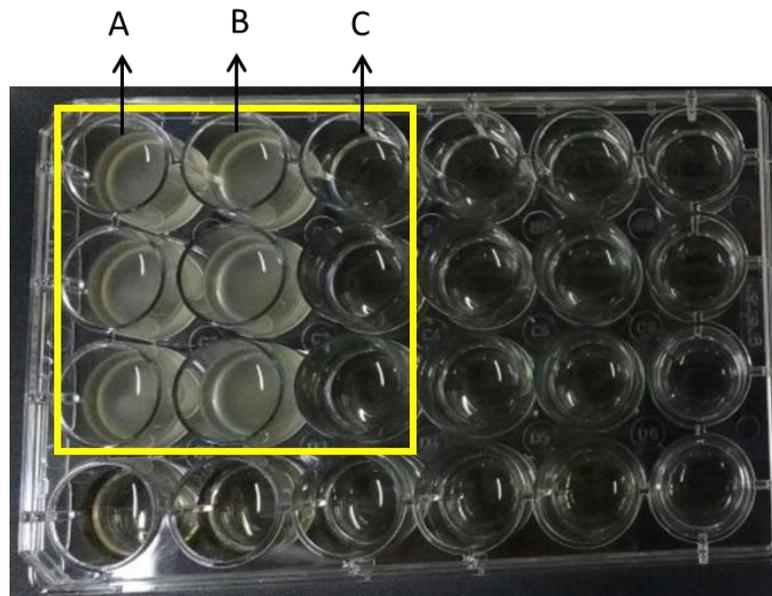


Figura 24. Determinación CIM de CIP mas PMHC. La columna A representa el control de crecimiento de *E. coli*. La columna B muestra el crecimiento de *E. coli* cuando se adicionó PMHC 10 μM y CIP 3 μM ; mientras que la C representa la inhibición del crecimiento de *E. coli* expuesta a 3 μM de CIP.

Desde un punto de vista general, la vida de una célula se la puede describir como un equilibrio entre la tasa metabólica y la capacidad de la célula para eliminar ERO. Tanto las células eucariotas como procariontas han desarrollado mecanismos antioxidantes endógenos eficientes (Cabiscol y col., 2000; Imlay, 2008). Asimismo, algunos de estos sistemas en bacterias se han asociado con la tolerancia a antibióticos. Trabajos realizados con diferentes mutantes de *E. coli* y *P. aeruginosa* demostraron tolerancia a una amplia gama de antibióticos debido al aumento en la producción de enzimas antioxidantes que bloquean la generación de moléculas pro-oxidantes, y

reducen así la toxicidad de los radicales nocivos (Nguyen y col., 2011; Shatalin y col., 2011). Por otro lado, el pretratamiento con el antioxidante glutatión evidenció una protección significativa frente al tratamiento con antibióticos bactericidas (Goswami y col., 2006; Masi y col., 2006; Allison y col., 2011; Smirnova y col., 2012). Confirmando estas observaciones, se demostró el bloqueo de la lesión oxidativa causada por CIP cuando se adicionó una baja concentración del antioxidante PMHC, con el consecuente aumento de la concentración inhibitoria mínima.

Los estudios descriptos se realizaron durante dos estadías de investigación en la Universidad de McGill, Montreal, Canadá, bajo la dirección del Prof. Dr. Gonzalo Cosa y la colaboración del Dr. Andrés M. Durantini.

Las investigaciones ilustraron uno de los eventos oxidativos más relevantes para las células ocasionado por el antibiótico bactericida CIP. Se describió la inducción de la PL en diferentes cepas bacterianas de relevancia, de las cuales las cepas Gram negativas exhibieron, en general, un daño oxidativo superior, aunque, este evento fue particular en cada cepa. Los experimentos de capturas de imágenes permitieron comprender este fenómeno oxidativo en células individuales de la bacteria *E. coli*. La visualización directa de la evolución del aumento de la intensidad de fluorescencia emitida vislumbró un fenómeno heterogéneo que podría depender del estado metabólico de cada bacilo. Esta conclusión se despliega del hecho de que algunas células comenzaron a mostrarse brillantes desde el inicio del experimento y que podrían encontrarse en un estado de estrés oxidativo avanzado; mientras que, en gran parte de las poblaciones estudiadas, el progreso del proceso de oxidación de lípidos fue aumentando con el transcurso del tiempo. En consecuencia, se reveló un comportamiento diferencial entre las células individuales.

Los resultados obtenidos resultan de gran relevancia ya que para comprender en profundidad los cambios metabólicos inducidos en las células hay que tener en cuenta que células aparentemente idénticas pueden comportarse de manera diferente, por lo que los estudios en células únicas se vuelven necesarios. El sistema desarrollado podría aplicarse para comprender las estrategias de supervivencia bacteriana que operan en diferentes sistemas experimentales; y así incursionar en el entendimiento de la evolución de la resiliencia de los patógenos al tratamiento con antibióticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: PARTE III

En base a los antecedentes citados y los resultados obtenidos previamente con derivados de bencenosulfonilos (BS) de heterociclos (Het) de la Quimioteca desarrollada por el grupo de química Medicinal dirigido por la Prof. Dra. María Rosa Mazzieri y presentados previamente en la introducción (Figura 4), nos planteamos las siguientes 3 preguntas como parte del objetivo específico direccionado a investigar la susceptibilidad de cepas de referencia y cepas clínicas a derivados de N-bencenosulfonilos de heterociclos (BS-Het) y relacionarla con la capacidad de generar estrés oxidativo: ¿Cuáles de estos derivados sintéticos presentan actividad antimicrobiana?, ¿Inducen la generación de estrés oxidativo como parte de su mecanismo de acción? Y, ¿Se podrá identificar un potencial blanco bacteriano?

3.1 Determinación de la compatibilidad de derivados de síntesis en medios biológicos: equilibrio entre sistemas de solventes y la viabilidad de las cepas bacterianas

En la primera etapa de trabajo se abordó la búsqueda sistemática de solventes que pudieran ser utilizados en los ensayos biológicos, debido a que los BS-Het son compuestos con muy baja solubilidad acuosa. Esta característica es ocasionada principalmente por su alta lipofilicidad, lo que contribuye favorablemente a la penetración del fármaco a través de las membranas biológicas, pero presenta un desafío a la hora de elegir un solvente apropiado. Estos deben ser compatibles con los medios biológicos (caldos de cultivo y buffers) utilizados en los experimentos, al mismo tiempo no deben afectar la viabilidad celular ni la estabilidad química de los compuestos.

Se evaluó la viabilidad bacteriana en dos cepas de referencia, una Gram positiva *S. aureus* ATCC 29213 (SAMS) y otra Gram negativa *E. coli* ATCC 25922, en los sistemas de solventes seleccionados que se muestran en la Figura 25. Uno de los solventes utilizados para ensayos microbiológicos es DMSO (Torres y col., 2011; Segura y col., 2012; Mi y col., 2016) aunque en algunos casos se requiere de más de un solvente para incrementar la solubilidad de los compuestos a ensayar, a esto se denomina cosolvencia.¹

¹ Cosolvencia: vehículos que se usan combinados para aumentar la solubilidad de un fármaco, y a menudo la solubilidad de este sistema mixto es mayor que lo que se puede predecir a partir de la solubilidad del material en cada solvente por separado

DMSO	DMSO
PEG 400	PEG 400
EtOH	EtOH
MeOH	DMSO
	PEG 400

Figura 25. Solventes (izquierda) y sistemas de cosolvencia (derecha) utilizados

En primera instancia, se determinó el crecimiento bacteriano, en el sistema de solventes, mediante turbidez aparente comparándolo con el control (cultivo no tratado); en segundo lugar, se realizó recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3, en donde se detallan los solventes ensayados y sus combinaciones.

Tabla 3. Solventes compatibles con la viabilidad bacteriana

Solvente	% Solvente en sol. final	Resultados
PEG 400	20	Inhibición
PEG 400	10	Crecimiento
PEG 400	5	Crecimiento
EtOH	20	Inhibición
EtOH	10	Crecimiento
EtOH	5	Crecimiento
MeOH	20	Inhibición
MeOH	10	Crecimiento
MeOH	5	Crecimiento
DMSO:PEG 400	10:5	Crecimiento
DMSO: PEG 400: EtOH	10:5:2	Crecimiento

Se seleccionaron 16 estructuras químicas (Figura 26) para las pruebas de solubilidad y estabilidad en los medios biológicos, de las cuales sólo dos, BS-THQ y 4-NH₂BS-THQ, se comportaron como soluciones verdaderas y estables en el período de

estudio. Por tal motivo, estos compuestos fueron candidatos para los posteriores ensayos biológicos.

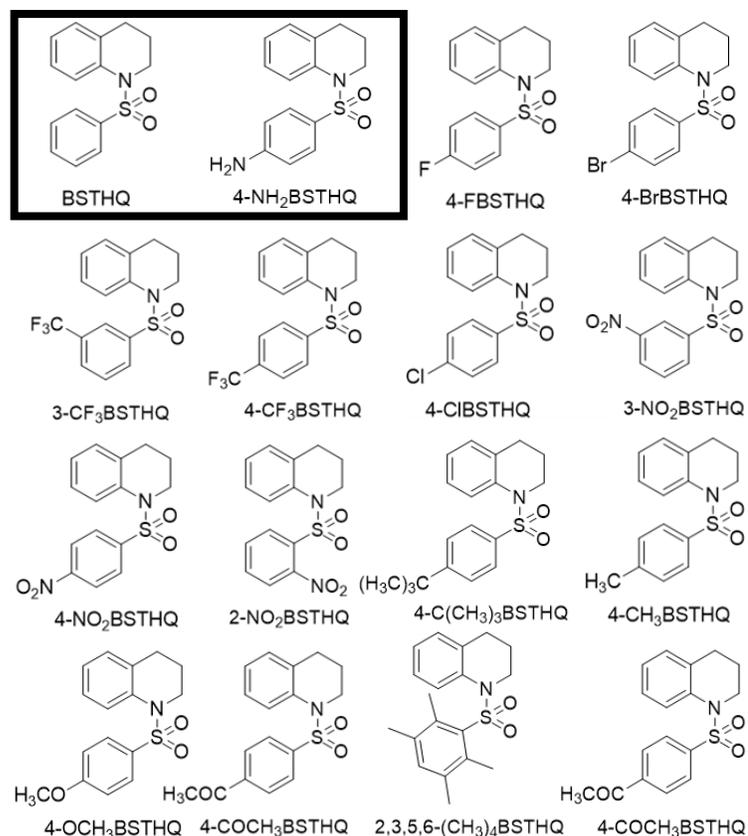


Figura 26. Estructuras químicas sometidas a ensayos de solubilidad. Las dos estructuras remarcadas fueron seleccionadas para posteriores ensayos biológicos.

Los solventes seleccionados fueron MeOH para el derivado sustituido (4-NH₂BSTHQ) y una combinación de solventes DMSO: PEG 400 en la proporción 2:1 para BSTHQ. En el caso de este último, se seleccionó la combinación de dos solventes debido a que un tercer solvente no producía un incremento notable en la solubilidad. La viabilidad bacteriana frente a la combinación DMSO: PEG 400 se detalla en la Figura 27. Se observó que no hay alteración en el crecimiento de las cepas seleccionadas cuando fueron expuestas a los volúmenes de solventes orgánicos utilizados para los ensayos biológicos.

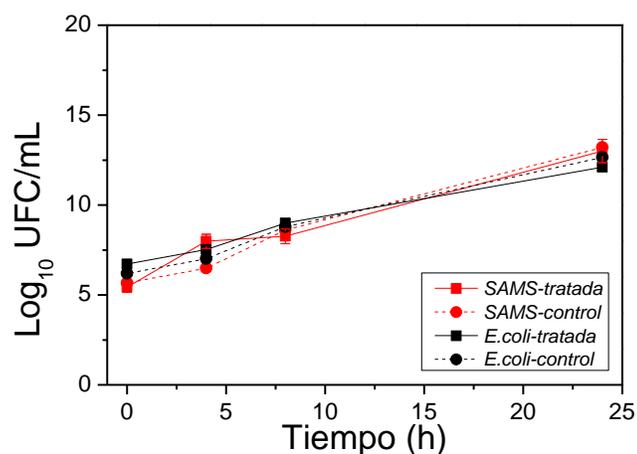


Figura 27. Curva de crecimiento bacteriano en función del tiempo para cepas expuestas a los solventes DMSO y PEG 400, y no expuestas (control).

Todos los compuestos de la quimioteca presentaron características “*drug-like*”, es decir, se las clasificaría *a priori* con propiedades fisicoquímicas similares a fármacos. Para obtener esta información se utilizó el programa *MOLINSPIRATION*². Ésta es una plataforma interactiva de libre acceso disponible en internet, mediante la cual se analizaron las propiedades fisicoquímicas relevantes para los derivados BS-Het incluyendo: CLogP (Logaritmo P calculado) es una medida de la lipofilicidad de una sustancia; PM (peso molecular) para que un compuesto sea absorbido y llegue a su sitio de acción debe tener un PM tan bajo como sea posible (< 450); PSA (superficie área polar) es un parámetro para determinar la capacidad de un fármaco para permear las células; y la regla de 5 descriptores de Lipinski. Estos parámetros ayudan definir si un compuesto será activo cuando es administrado por vía oral (Veber y col., 2002), siendo de gran relevancia para el diseño de fármacos. Lipinski y col. (2001), en su trabajo describen que hay una relación muy estrecha entre las propiedades fisicoquímicas y la potencia de un compuesto. Una pobre solubilidad y permeabilidad puede ser tolerada en candidatos altamente potentes, pero se necesitan propiedades fisicoquímicas más favorables en el caso de aquellos de baja potencia. Ambos candidatos, BS-THQ y 4-NH₂BS-THQ presentaron una puntuación favorable según las 5 reglas establecidas por Lipinski, así como también un adecuado PM, un alto CLogP y acorde PSA. Esto indicaría que los compuestos pueden correlacionarse con una biodisponibilidad oral favorable en futuras etapas clínicas.

² Molinspiration: programa de Software libre que se utiliza como predictor de características específicas de una estructura química.

3.2 Evaluación del perfil de actividad antibacteriana de BS-THQ y 4-NH₂BS-THQ

El prototipo (BS-THQ) presentó una CIM de 200 µg/mL frente a las cepas *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300 (SAMR) y *S. aureus* ATCC 29213 (SAMS), y superior a 200 µg/mL para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. En el caso de las cepas Gram negativas, no se determinó con exactitud la CIM porque a concentraciones por encima de 250 µg/mL el compuesto presentó problemas de solubilidad. El derivado sustituido con el grupo amino (4-NH₂BS-THQ) exhibió actividad inhibitoria a 100 µg/mL en las 4 cepas estudiadas. También se evaluó el perfil bactericida del prototipo, el cual corresponde a la reducción del cultivo bacteriano inicial en un 99.9%, por curva de muerte bacteriana en la cepa Gram positiva se observó una reducción mayor a 3 log₁₀ tanto en SAMS ATCC 29213 y SAMR ATCC 43300 (Figura 28), esto indica que los compuestos son de carácter bactericida.

Por lo tanto, los resultados obtenidos revelaron que la sustitución del grupo amino no sólo mejoró la actividad inhibitoria *in vitro*, sino que, además, amplió el espectro de acción a bacterias Gram negativas. Pagliero y col. (2011) reportaron la síntesis y actividad antibacteriana de 5 derivados BS-Het frente a *E. coli*, los cuales presentaron CIM mayor a 32 µg/mL y no exhibieron actividad en *S. aureus*. Por otro lado, trabajos científicos han demostrado como las sustituciones o modificaciones estructurales pueden llevar a una mejora en el espectro de acción de un fármaco, como lo señalado por Rose y col. (2006) para la tigeciclina, una estructura derivada del antibiótico tetraciclina.

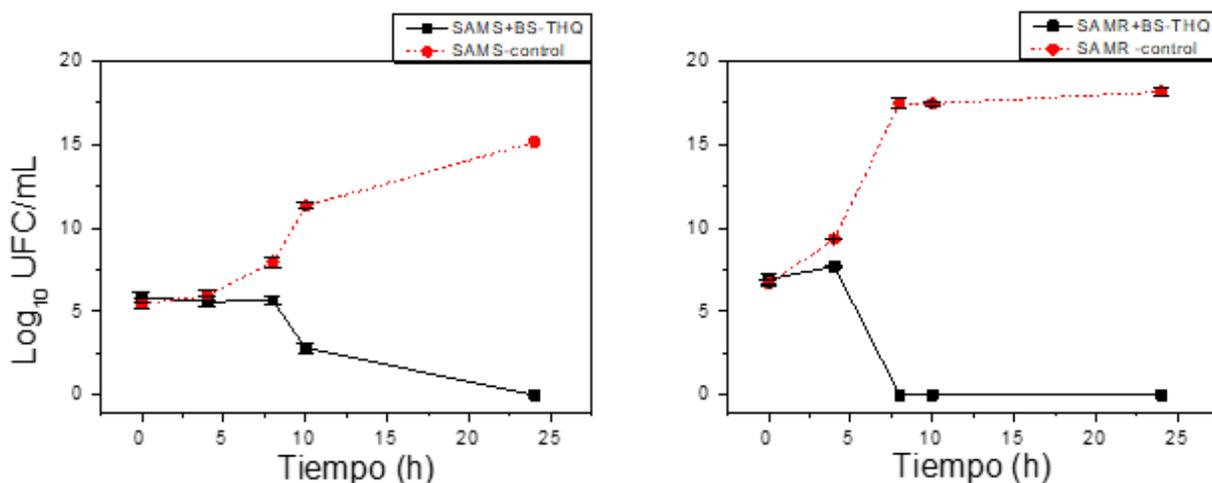


Figura 28. Curvas de muerte bacteriana en cepas Gram positivas SAMS ATCC 29213 (gráfico izquierdo) y SAMR ATCC 43300 (gráfico derecha) con el prototipo BS-THQ.

3.3 Investigación de la generación de ERO y ERN

El ensayo colorimétrico de reducción del reactivo azul de nitrotetrazolio (NBT) en presencia de O_2^- permitió realizar un primer *screening* de producción de especies reactivas. En la Figura 29 se detalla el porcentaje de aumento de ERO respecto del control (cultivo no tratado) en función de una concentración creciente de BS-THQ (Figura 29A) o 4-NH₂BS-THQ (Figura 29B). En el caso del prototipo, se observó un aumento dosis dependiente para la cepa SAMS ATCC 29213, mientras que la cepa SAMR ATCC 43300 exhibió un aumento significativo (*p< 0,05) a la máxima concentración utilizada, la cual corresponde a la CIM. Sin embargo, en las cepas de *S. aureus* se observó una notable diferencia en la generación de radicales entre ambos compuestos con un claro aumento de O_2^- a concentraciones inferiores a la CIM (12,5 µg/mL) con 4-NH₂BSTHQ. Cabe destacar que el estrés inducido en la cepa SAMR alcanzó casi el 80% en la producción O_2^- . Asimismo, el derivado amino afectó el metabolismo oxidativo en cepas Gram negativas. El porcentaje de especies reactivas fue de 70% y 20% para *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente, a la concentración sub-CIM de 12,5 µg/mL. Los resultados obtenidos demostraron que existe una diferencia evidente en la generación de O_2^- y el metabolismo respiratorio entre las cepas frente a los compuestos estudiados.

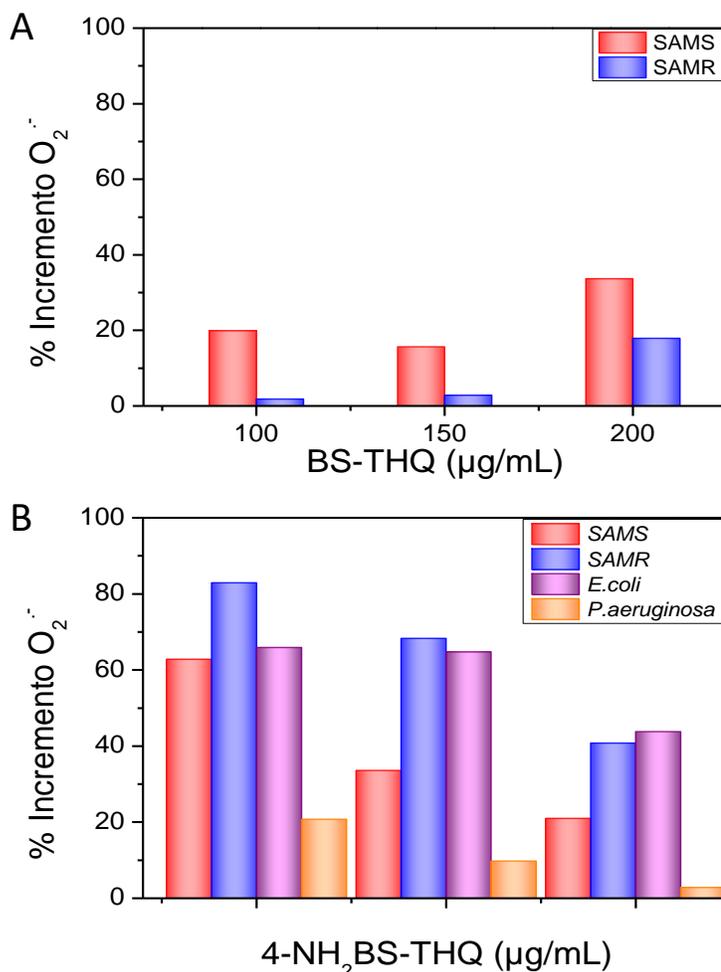


Figura 29. Determinación del porcentaje de aumento de O₂⁻ en función de la concentración de BS-THQ y 4-NH₂BS-THQ mediante el ensayo de reducción de NBT.

Para profundizar y ampliar el estudio de la producción de ERO y ERN se utilizó la microscopía de fluorescencia aplicando el colorante diacetato 2',7'-dicloro dihidrofluoresceína (H₂DCFDA). Los resultados obtenidos permitieron realizar un análisis cualitativo de las imágenes capturadas posterior a cada tratamiento. Se evaluó el prototipo, para realizar un primer estudio por fluorescencia, y se utilizó CIP como control positivo (Figura 30E representa a SAMS y 30F a SAMR) debido a que la generación de ERO ha sido ampliamente descrita para este antibiótico. Los cultivos sin tratar (controles) de SAMS ATCC 29213 y SAMR ATCC 43300 se muestran en la Figura 30A y 30B, respectivamente. La cepa SAMS ATCC 29213 mostró un aumento de la intensidad de fluorescencia (Figura 30C) comparado con el control (Figura 30A); al igual que SAMR reveló una mayor intensidad (Figura 30D) fluorescente respecto de su basal. Es de destacar la congruencia entre los resultados obtenidos por el ensayo colorimétrico de NBT con los de microscopía de fluorescencia. Sin embargo, por fluorescencia no solo se

detectan especies del oxígeno por lo cual la fluorescencia de la cepa SAMR ATCC 43300 cualitativamente simula ser superior.

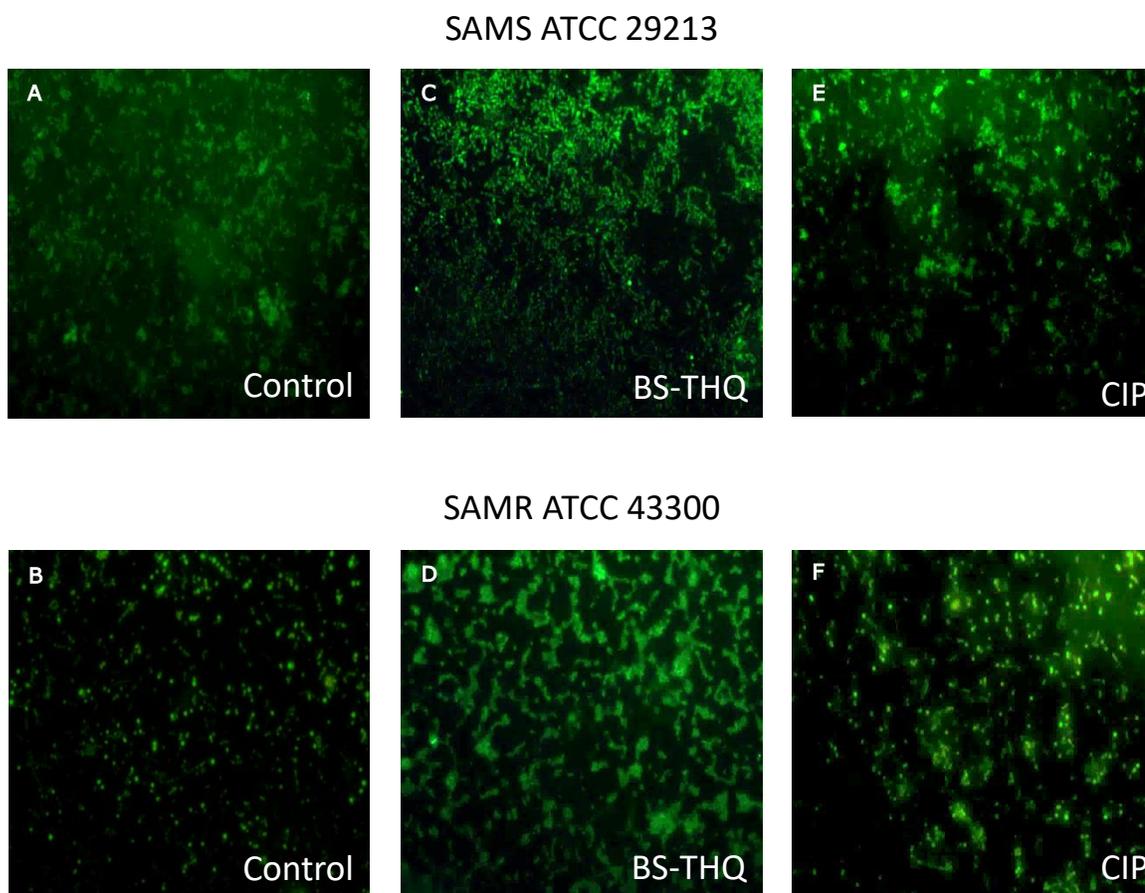


Figura 30. Visualización de la intensidad fluorescente de las cepas SAMS ATCC 29213 y SAMR ATCC 43300, mediante microscopía post tratamiento con BS-THQ (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o CIP (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 2 h.

Asimismo, se investigó la producción de ERO y ERN en el derivado sustituido a través de espectrofluorometría con la misma sonda utilizada para las pruebas de microscopía de fluorescencia, con la finalidad de cuantificar el estrés inducido. En la Figura 31 se detalla la intensidad fluorescente en función de concentraciones crecientes de 4-NH₂BS-THQ, los controles (cultivos no tratados) presentaron una intensidad fluorescente que corresponde al metabolismo basal de cada bacteria. Las cepas Gram positivas manifestaron una producción de especies reactivas dosis dependiente siendo mayor en SAMS que la cepa SAMR. Ambas cepas evidenciaron valores de intensidades fluorescentes superiores a las cepas Gram negativas; observándose en *E. coli* un incremento del 40% respecto del basal, a la CIM. En el caso de *P. aeruginosa*, no se observó aumento cuando se trató con el derivado sustituido.

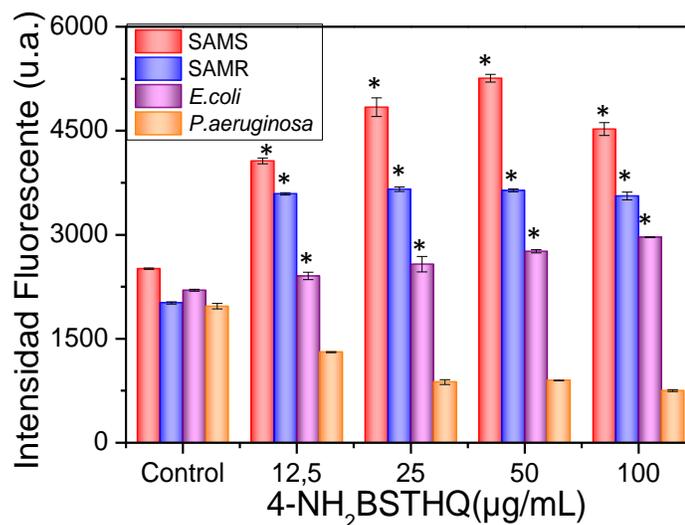


Figura 31. Cuantificación de la producción de ERO y ERN mediante espectrofluorometría con la sonda H₂DCFDA. Test de significancia *P<0,05 respecto del control.

Por otro lado, se pretendió determinar con mayor precisión si el metabolismo del nitrógeno se afectaba cuando los cultivos fueron expuestos a 4-NH₂BS-THQ y BS-THQ. Mediante el ensayo de determinación de producción de NO₂⁻, se observó un incremento dosis-dependiente en el caso del prototipo, siendo 2 veces el aumento respecto del control para SAMR y 1,7 veces para SAMS, a la CIM. Las cepas Gram negativas no se evaluaron con BS-THQ ya que la CIM de este derivado fue > 200 µg/mL y no pudo determinarse con exactitud en las cepas. Las cepas SAMS y SAMR evaluadas con el derivado sustituido (Figura 32) evidenciaron aumentos expresados como valores normalizados en el rango de 12 a 16,5 veces para SAMS y entre 9 a 11 veces para SAMS, respecto de los niveles basales de producción de ERN para cada especie. En contraste, *P. aeruginosa* reveló una producción de ERN entre 1,5 a 3,6 veces respecto del control, que al momento no había mostrado elevación de especies reactivas por las otras metodologías aplicadas. Mientras que en *E. coli* no se apreció efecto inductor de ERN. Es importante resaltar el hecho que ambas cepas Gram negativas revelaron los mayores

niveles basales de NaNO_2 ; esto podría estar relacionado a un mecanismo principal de detoxificación en estas especies.

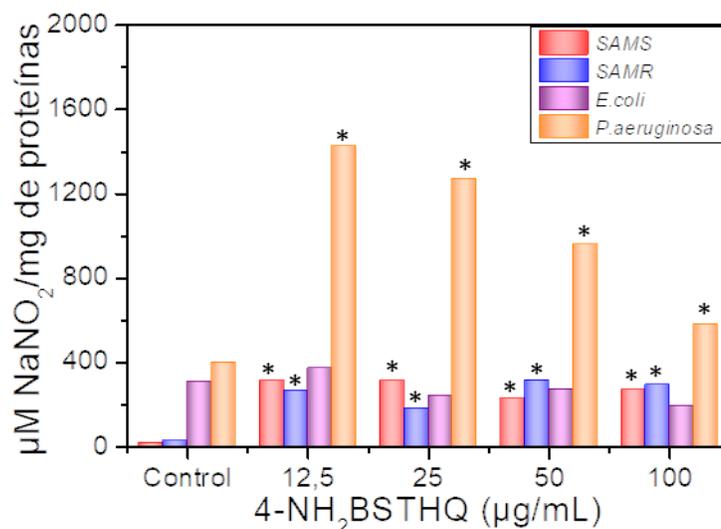


Figura 32. Producción de NO_2^- (expresado como $\mu\text{M NaNO}_2/\text{mg}$ de proteína) en función de la concentración de 4-NH₂BSTHQ.

El producto de la reacción entre el óxido nítrico (NO) y el radical anión superóxido (O_2^-), es el peroxinitrito, radical nocivo que promueve lesión oxidativa (Radi y col., 2001). Este intermediario reactivo de nitrógeno puede alterar proteínas, ADN y lípidos de diferentes maneras. Por lo tanto, los altos niveles de ERN en las cepas SAMS y SAMR obtenidos luego del tratamiento con 4-NH₂BS-THQ podrían ser una consecuencia de la reacción química mencionada anteriormente. Sin embargo, *E. coli* y *P. aeruginosa*, no presentaron inducción elevada de ERN, lo que puede atribuirse al hecho de que la producción de estas especies está relacionada con el metabolismo y los mecanismos de detoxificación de cada patógeno en particular (O'Reilly y col., 2002). El efecto del estrés oxidativo y nitrosativo es una de las fuentes más importantes de alteraciones metabólicas y daño celular (Kohanski y col., 2007). Estudios publicados previamente han demostrado que antibióticos con diferentes mecanismos de acción pueden estimular la inducción de ERO y ERN, lo que conduce a un daño macromolecular, tanto en cepas Gram positivas como Gram negativas (Becerra y col., 2006; Aiassa y col., 2010; Aiassa y col., 2012; Paéz y col., 2010). Estos agentes también están involucrados en modificaciones de la membrana plasmática, en consecuencia, producen alteraciones que conllevan a la muerte celular (Scott y col., 1988; Paéz y col., 2013). Wenzel y col. (2013) han reportado nuevos compuestos heterocíclicos con propiedades antibacterianas frente a cepas de *S. aureus*, incluidas cepas SAMR. Los autores proponen

como potencial mecanismo, una alteración estructural de la membrana asociada al aumento en la generación de ERO. Por otro lado, Desai y col. (2014) describieron un nuevo compuesto con actividad frente a *E. coli*, el cual induce estrés oxidativo y ligó este efecto con la muerte celular bacteriana.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que BS-THQ y su análogo 4-NH₂BS-THQ son capaces de afectar el ciclo redox y como parte de ello causar muerte celular bacteriana, a través de la producción de especies reactivas. El derivado 4-amino sustituido produjo mayores niveles de ERO en comparación con BS-THQ en ambas cepas de *S. aureus* (SAMS ATCC 29213 y SAMR ATCC 43300). Esto indica una perturbación mayor en el metabolismo respiratorio, debido a que indujo un 60% y 80% de aumento de especies reactivas a la concentración sub-CIM de 12,5 µg/mL en SAMS ATCC 29213 y SAMR ATCC 43300, respectivamente. Desde un punto de vista estructural, estos hallazgos pueden atribuirse a la sustitución amina en el grupo BS, aunque deberían probarse otras sustituciones con el grupo amina para confirmar este efecto.

3.4 Evaluación de la respuesta de un sistema antioxidante enzimático: Determinación cuantitativa de la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD)

La inducción de la enzima SOD se determinó a las 2 y 4 h de tratamiento con el derivado sustituido, debido a que este presentó una mayor generación de especies reactivas. Luego de 2 h de exposición no se observó un cambio aparente comparado con el cultivo sin tratar (control). Esta tendencia se mantuvo en todas las cepas, independientemente de su género (Figura 33). Posterior a 4 h de tratamiento con 4-NH₂BS-THQ (Figura 33) tanto la cepa SAMS como *E. coli* revelaron un comportamiento semejante, presentando una inducción de la enzima del 30% comparado con el control. Esta tendencia fue homogénea en todas las concentraciones ensayadas. Mientras que SAMR y *P. aeruginosa* presentaron un patrón de inducción dosis-dependiente; siendo la máxima de un 80% para SAMR a la CIM y un 100% en *P. aeruginosa* (sub-CIM: 50 µg/mL).

La SOD es una de las enzimas presentes en células procariotas necesarias para controlar el estrés oxidativo. Su función es prevenir el daño en los diferentes componentes celulares que pueden ser ocasionados por radicales libres. Estos pueden ser generados durante el metabolismo aeróbico (Shen y col., 1997), así como también ocasionados por antibióticos bactericidas, los cuales aceleran el metabolismo respiratorio (Dwyer y col., 2014). Nuestros experimentos mostraron un incremento de la actividad SOD, luego del tratamiento con 4-NH₂BSTHQ en las cepas SAMS, SAMR, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Esto indica que el estrés oxidativo generado podría inducir la actividad de esta enzima para detoxificar las especies reactivas nocivas para la célula y así compensar el desbalance oxidativo. Asimismo, se ha publicado que el efecto bactericida de quinolonas en *E. coli* está ligado a la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno, conducido por las isoformas de superóxido dismutasa SodA y

SodB. Este mecanismo es contiguo a la reacción de Fenton y la formación del radical hidroxilo que conlleva a la muerte celular bacteriana (Kotova y col., 2014). Trabajos recientes relacionan la actividad bactericida de un derivado estructuralmente similar, frente a cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Zeraik y col., 2014), y la generación de ERO. Los autores destacan la relación entre la inducción de las enzimas SOD y catalasa, las cuales se ven aumentadas como mecanismo de detoxificación de H_2O_2 y O_2^- (Ajiboye y col., 2017). Los mismos patrones son observados con el derivado 4-NH₂BS-THQ utilizado en este trabajo de tesis.

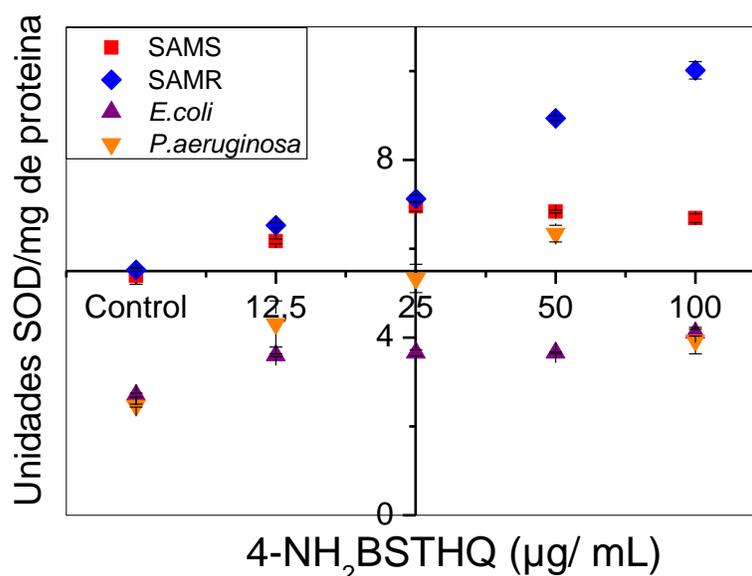


Figura 33. Actividad de la enzima SOD, determinada a las 4 h de incubación, en función de la concentración de antimicrobiano comparado con su control (cultivo no tratado). * $p < 0.05$, en todos los casos los tratamientos fueron significativos respecto de su control.

3.5.1 Cuantificación del daño en macromoléculas

Los productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP) son considerados un biomarcador de daño oxidativo y son una vía de cuantificación de proteínas oxidadas (Witko-Sarsat y col., 1996). Para comprender mejor el impacto de las especies reactivas en el daño celular, se siguió la evolución de los AOPP en el tiempo (0, 2, 4, 6, 10, 24 h) tratados con diferentes concentraciones (sub-CIM y CIM) de BS-THQ o 4-NH₂BS-THQ.

La Figura 34 expone la tendencia de aumento de AOPP (respecto del cultivo sin tratar) cuando cada cepa fue tratada a la CIM. Ambos derivados provocaron un aumento en los niveles de oxidación de proteínas en todas las cepas estudiadas, lo que refuerza la hipótesis de que inducen la producción de ERO. En general, se apreció un efecto dosis-dependiente, el aumento se produjo luego de las 4 h de exposición, observándose los

valores máximos a las 24 h. Los perfiles de daño oxidativo en las cepas de SAMS y SAMR, cuando se incubaron con BS-THQ, fueron de 33,8% y 46,8% respecto del control; mientras que, luego del tratamiento con el derivado sustituido, fueron de 45,6% y 63,5%, respectivamente. Estos resultados están en relación con la mayor inducción de ERO y ERN, obtenidos con el derivado sustituido (Figura 31 y 32). Las cepas Gram negativas, *E. coli* y *P. aeruginosa*, arrojaron valores de AOPP de 48% y 39%. En el caso de la última, el menor daño en macromoléculas podría asociarse a que en esta cepa sólo se observó una baja inducción de ERN, mientras que el resto de las cepas estudiadas produjeron aumento de especies de oxígeno y nitrógeno en distintas proporciones.

Los resultados encontrados en nuestro grupo de investigación han demostrado que diferentes clases de antibióticos, como CIP, ceftazidima, cloranfenicol y piperacilina, inducen estrés oxidativo en varios géneros bacterianos y como consecuencia de éste aumentan los niveles de AOPP (Paéz y col., 2011; Aiassa y col., 2013). Del mismo modo, en la presente tesis corroboramos el incremento de ERO, el cual produjo un daño oxidativo que se cuantificó por un aumento de AOPP. Estos productos de oxidación avanzada se observaron después de la generación de especies reactivas (luego de 2 h de tratamiento) y se identificó un claro incremento entre las 4 y 6 h de exposición frente a los derivados. Estos resultados demostraron que el daño oxidativo en macromoléculas es acumulativo y se prolonga en el tiempo, aunque los tiempos de vida de estas especies reactivas sean muy cortos. Se puede concluir que los ERO y ERN se producen en diferentes estadios de la célula y se prolongan hasta la muerte celular.

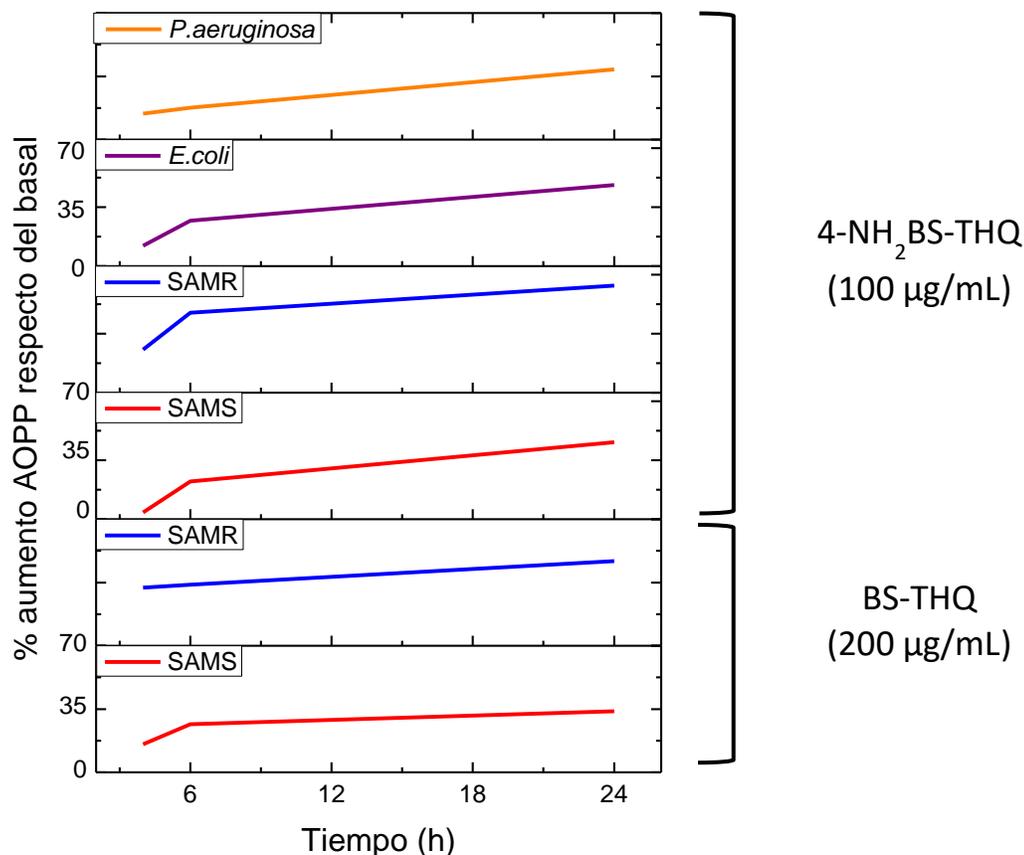


Figura 34. Aumento de AOPP en función del tiempo para cepas de SAMS, SAMR, *E. coli* y *P. aeruginosa*. En todos los casos se obtuvo $*p < 0,05$ respecto del control.

3.5.2 Análisis del daño inducido por BS-THQ y 4-NH₂BS-THQ por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión se seleccionó para determinar si BS-THQ y su derivado sustituido afectaban la morfología de las células bacterianas. El análisis se realizó en la cepa Gram positiva SAMS ATCC 29213 (Figura 35) tratada con BS-THQ (150 µg/mL) y en *E. coli* ATCC 25922 (Figura 36) expuesta a 4-NH₂BSTHQ (75 µg/mL). La Figura 35 ilustra el cultivo de *S. aureus* sin tratar (Figura 35 A y B). Estas imágenes no reflejan alteraciones en la estructura de los cocos. Sin embargo, posterior al tratamiento se visualizaron cambios a nivel de la membrana, volviéndose amorfa e irregular la estructura del coco (Figura 35 D). También se observaron algunas células fantasmas, las cuales presentan membranas difusas e indistinguibles del resto del contenido celular (Figura 35 C y E). Además, se puede señalar la formación de vesículas y retracciones de la membrana plasmática (35 C, D, E, F y G).

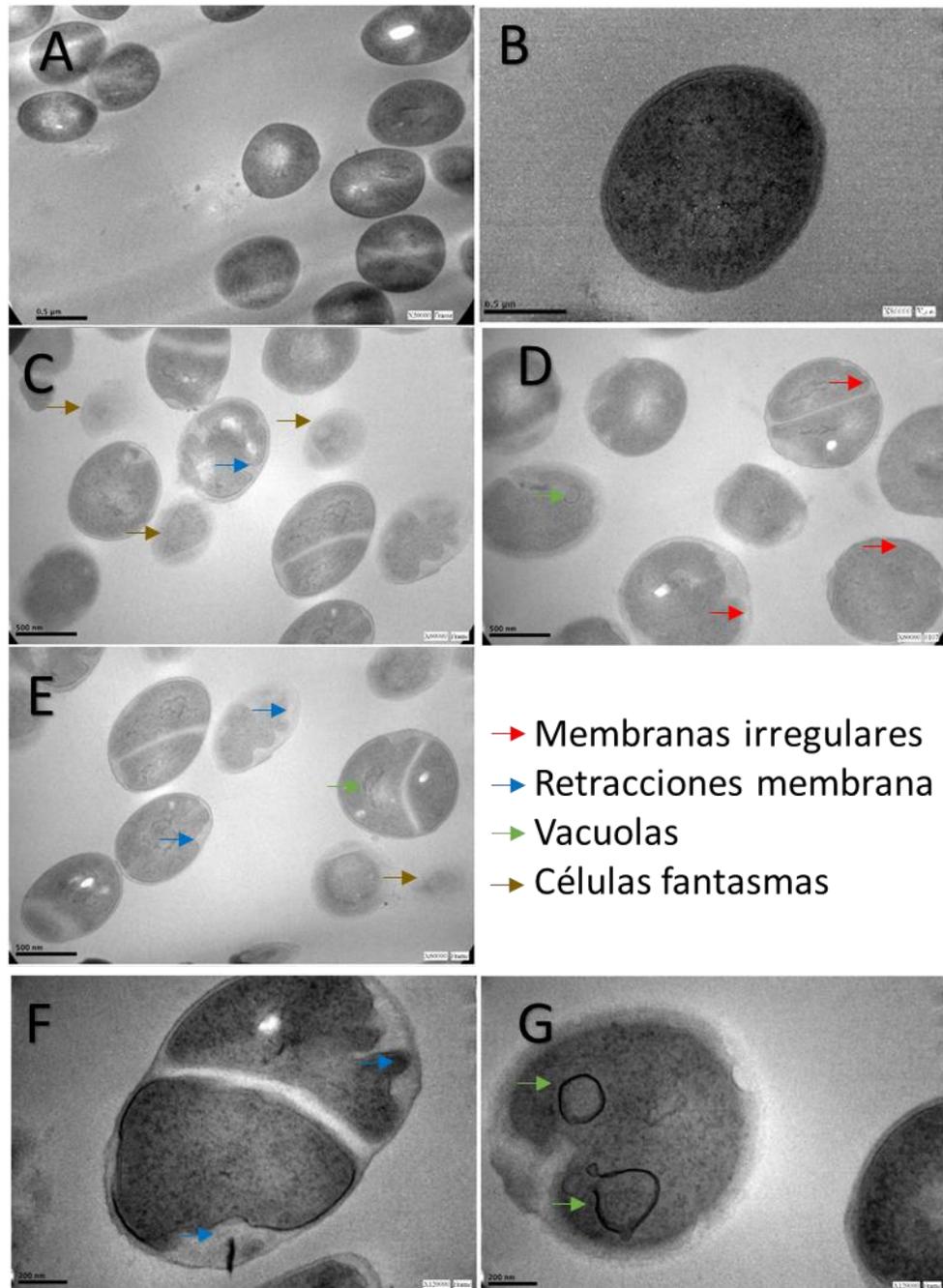


Figura 35. Micrografías en SAMS ATCC 29213. Micrografías A y B controles sin tratar. Imágenes C, D, E, F y G, diferentes campos y magnificaciones de la cepa expuesta a BS-THQ.

E. coli expuesta a 4-NH₂BS-THQ mostró varios cambios morfológicos como una superficie rugosa (Figura 36 C, D, E y G) no pudiéndose divisar en forma definida los límites de la membrana interna. Además, la densidad del protoplasma fue menor a la de la célula no tratada (Figura 36 C, D, E y F). Otro aspecto importante para destacar es que

se aprecia lisis celular (Figura 36 C y G), así como también desprendimiento e interrupción de la membrana externa (Figura 36 C, D y G).

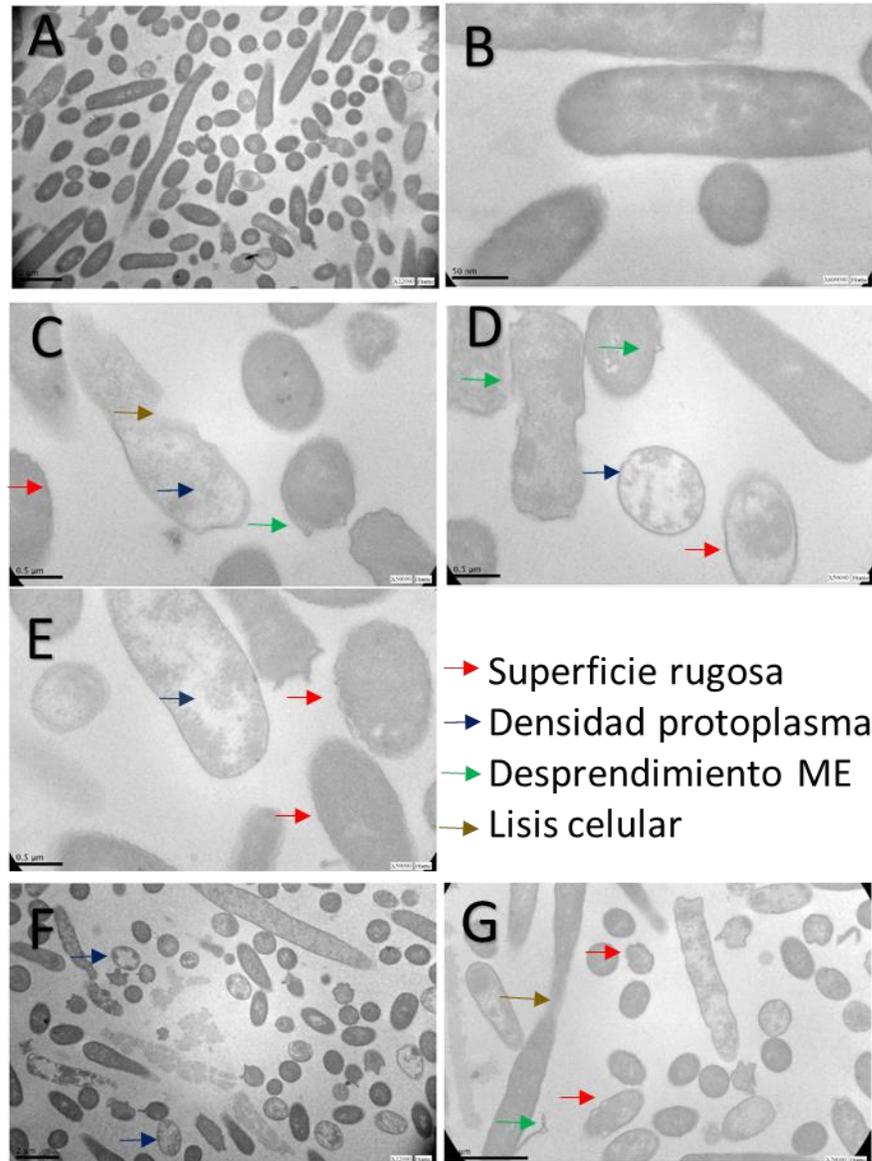


Figura 36. Microscopía electrónica de transmisión en *E. coli* ATCC 25922. Micrografías A y B controles sin tratar. Imágenes C, D, E, F y G, diferentes magnificaciones y campos de la cepa expuesta a 4-NH₂BSTHQ.

Los estudios de TEM son una herramienta útil para revelar con mayor claridad las alteraciones estructurales inducidas por compuestos con actividad antibacteriana (Otto y col., 2010; Silvero y col., 2014). Los resultados obtenidos cuando se ensayaron los BS-Het revelaron una clara desorganización de la membrana causada por BS-THQ en *S. aureus* y por 4-NH₂BSTHQ en *E. coli*. No obstante, He y col. (2014) han reportado

imágenes de TEM en *E. coli* tratadas con un antimicrobiano que actúa por mecanismo surfactante (Polimixina b) y el patrón de daño es diferente al observado en el presente trabajo de tesis, por lo que se sostiene que el mecanismo de acción, aunque aún desconocido para estos compuestos, es específico a nivel de la pared y membrana celular. Ambos fármacos, y en particular el último, tienen propiedades moleculares ventajosas (CLogP, PM y PSA) lo que podría explicar su buena interacción con la membrana bacteriana. Esta interacción puede facilitar la generación de ERO y ERN, alterando así la fisiología bacteriana lo que provoca un desequilibrio en el metabolismo oxidativo.

3.5.3 Cuantificación del daño oxidativo producido por BS-THQ y 4-NH₂BS-THQ en membranas miméticas

El ensayo de liberación del colorante carboxifluoresceína (CF) confinado en liposomas, se utilizó para investigar el daño que los derivados producen en membranas. Los resultados indican que, si un compuesto es capaz de interactuar con la bicapa lipídica, se produce una desestabilización de la membrana citoplasmática. Con este fin, se seleccionaron diferentes lípidos como: Lecitina de soja; DOPC (1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina); DOPE (1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina); DODAB (Dioctadecil dimetil bromuro de amonio); PG (1,2-diarachidonoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]), considerados miméticos de membranas biológicas. Estos lípidos se expusieron solos y en combinaciones a las concentraciones bactericidas de los derivados, por un período de 21 h. Paralelamente, se realizaron los controles pertinentes con los buffers y solventes utilizados. Se observó el mismo porcentaje de liberación del colorante para los controles (buffer + liposoma) que para los controles más el solvente (buffer + liposoma + solvente), indicando un daño oxidativo basal semejante a lo que sucede en los sistemas biológicos. Los valores obtenidos para los controles (liposoma + buffer + solvente) fueron: 15% para lecitina de soja; 18% para DOPC; mientras que para las combinaciones de lípidos fueron 23% para DOPC:PG; 28% para DOPC: DODAB y 8% para DOPC:DOPE (Figura 11C). El panel A de la Figura 37 refleja los resultados de la exposición con 4-NH₂BS-THQ, las tendencias obtenidas fueron similares observándose incrementos entre 1,2 y 1,7 veces comparados con el control. El compuesto BS-THQ presentó incrementos entre 1,2 y 2,5 veces, mostrando el mayor porcentaje de liberación en DOPC:DODAB. Estos resultados indicarían que, si bien los compuestos son capaces de interactuar con la bicapa de fosfolípidos, debido a sus características lipofílicas mencionadas previamente (CLogP, PM, TSA), no provocan una desestabilización total de la membrana citoplasmática por un efecto tipo surfactante.

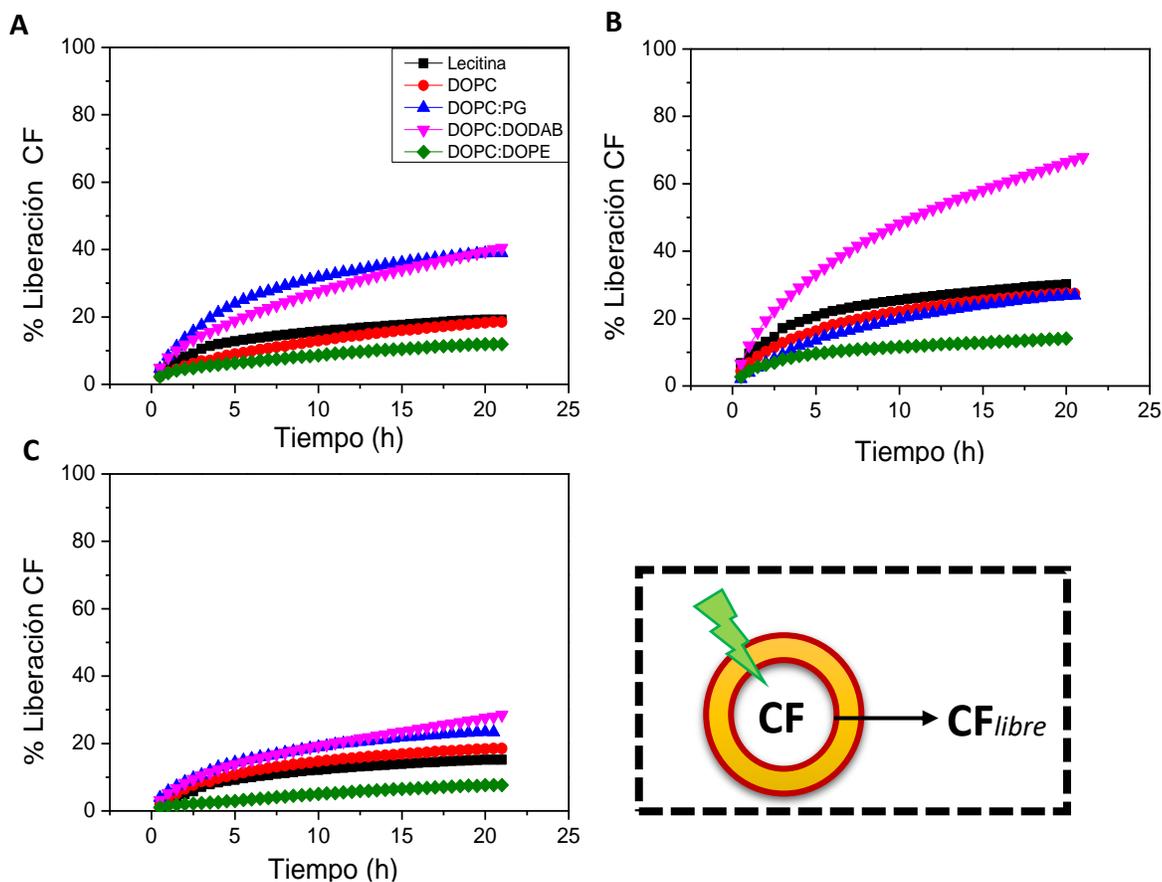


Figura 37. Liberación de CF en función del tiempo (h). Panel A, liberación de CF obtenida del tratamiento con 4-NH₂BS-THQ. Panel B, liposomas expuestos a BS-THQ. Panel C, liposomas sin tratamiento con los derivados.

Gerits y col., (2016) utilizaron el ensayo de liberación de CF para investigar interacción de nuevos compuestos con membranas miméticas, como parte de la elucidación del potencial mecanismo de acción de un compuesto bactericida. Al mismo tiempo, destacan que, a la concentración bactericida del compuesto se observa un daño total (100%) del liposoma luego de 3 h de exposición. En el caso de los derivados utilizados en el presente trabajo de tesis, los porcentajes de deterioro en la integridad del liposoma fueron inferiores al 30% (DOPC: DODAB expuesto a BS-THQ) luego de 21 h de incubación.

3.6 Exploración de la toxicidad de las moléculas mediante predicción estructural utilizando la herramienta OSIRIS® explorer

OSIRIS® es una plataforma informática interactiva de libre acceso, que calcula propiedades relevantes de fármacos, partiendo de la estructura dibujada por el usuario. El proceso de predicción recae sobre un listado que contiene un conjunto de fragmentos estructurales pre-computarizados, que alertan sobre riesgos en caso de ser encontrados en la molécula dibujada. La Figura 38 ejemplifica la puntuación que se obtiene del programa mediante la predicción de todas las estructuras moleculares disponibles, a partir de cuatro subconjuntos de la base de datos de RTECS.

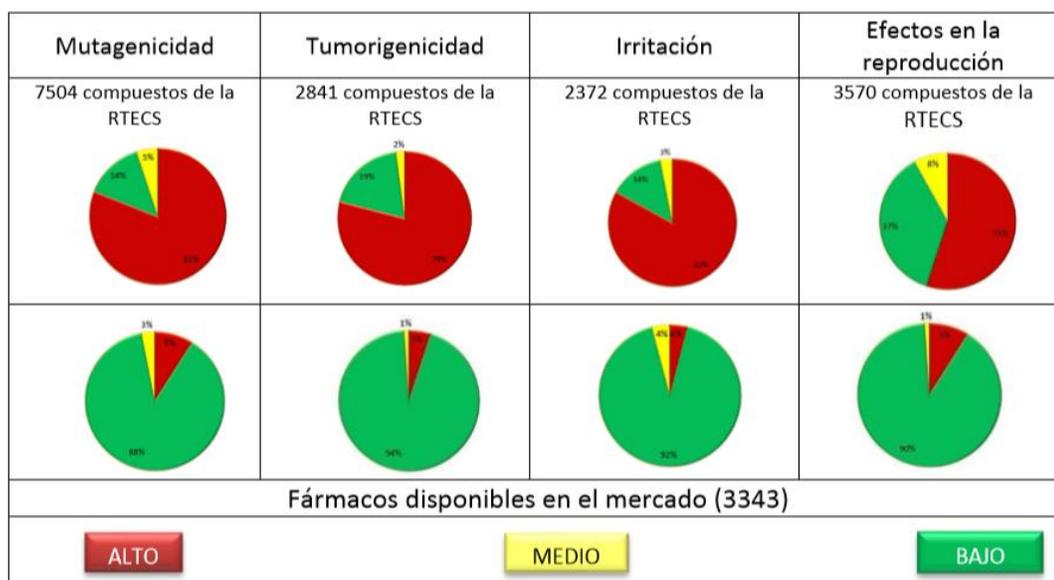


Figura 38. Evaluación de OSIRIS utilizando RTECS y fármacos disponibles en el mercado.

El prototipo y el derivado sustituido se sometieron al análisis de las diferentes clases de toxicidad: *Mutagenicidad, *Tumorigenicidad, *Efectos sobre la reproducción e *Irritación. El sistema da una puntuación de toxicidad basada en una codificación en colores que va desde toxicidad baja (color verde) hasta elevada (color rojo). Para BS-THQ la valoración fue intermedia (color naranja) mientras que 4-NH₂BS-THQ fue baja (color verde), lo que implica que el derivado sustituido presentó un mejor perfil farmacológico en cuanto a su toxicidad predicha.

3.7 Predicción del potencial mecanismo de acción: utilización de herramientas teóricas

Posterior a los ensayos biológicos realizados y al análisis de daño en membranas miméticas y celulares, surgió el interés por conocer el potencial blanco biológico por lo se proyectó realizar un estudio teórico. Este trabajo se llevó a cabo, en colaboración con los Dres. Sergio Ribone y Alfredo Quevedo del grupo de Química Medicinal Computacional del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas.

Mediante estudios computacionales es posible la identificación de posibles blancos biológicos, gracias a la disponibilidad de información tridimensional sobre la estructura de macromoléculas blanco, sobre la que se pretende ensayar algún ligando selectivo. Dichos datos suelen provenir de Cristalografía de Rayos X, Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de la proteína, o de modelos por homología. Las herramientas computacionales permiten abrir un abanico de estrategias para el descubrimiento de fármacos, para hacer este más eficiente y reducir los costos de la investigación farmacéutica. Se han desarrollado programas basados en diferentes algoritmos para hacer estudios de *docking* molecular, que han hecho de ésta una herramienta importante en la investigación farmacéutica.

En cuanto a la exploración de fármacos basado en la estructura, el *docking* molecular es uno de los métodos más utilizado desde principios de los años ochenta (Kontoyianni y col., 2008). Se define como un procedimiento de naturaleza iterativa destinado a evaluar cuantitativamente la complementariedad de un ligando por un receptor. A través del *docking* molecular, se realiza una aproximación de la interacción existente entre una pequeña molécula y una proteína a nivel atómico (Meng y col., 2011). El *docking* molecular requiere de dos etapas: una de “búsqueda” y otra de “evaluación” (Brooijmans y col., 2003). La primera se refiere a la exploración del espacio conformacional viable para el ligando dentro del receptor, y el objetivo es encontrar la orientación y conformación que corresponda al mínimo global de la energía de unión. Por su parte, la etapa de evaluación se refiere a la asignación de un valor numérico a cada una de las conformaciones generadas durante la etapa de búsqueda, permitiendo establecer un orden entre las diferentes posiciones y conformaciones encontradas (Sotriffer y col., 2003). La predicción o cálculo del modo de unión de un ligando con su receptor es muy valiosa para el entendimiento del modo de acción de moléculas con actividad biológica.

Las etapas de estudio de potenciales targets fueron las siguientes:

1. En primer lugar, se buscaron todos los targets reportados en *E. coli*, los cuales se obtienen de bases de datos disponibles en la web de ChEMBL (www.ebi.ac.uk/chembl/), dependiente del *European Bioinformatics Institute*. En bibliografía hay 81.008 compuestos ensayados en esta bacteria
2. La segunda etapa, consta de una exploración por similitud estructural con BS-THQ y el derivado sustituido, de todas aquellas moléculas que han sido

previamente publicadas en la cepa de interés. Se hallaron 38 estructuras descritas (Green y col., 2012), las cuales pasaron a ser el grupo de prueba para este estudio. La Figura 39 muestra la estructura química del grupo de prueba con diversos sustituyentes en la posición R.

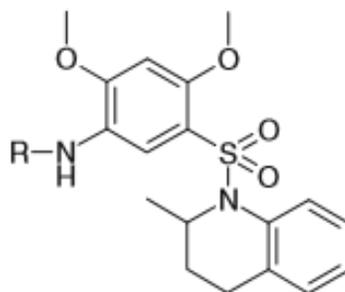


Figura 39. Estructura química del grupo de prueba

El blanco terapéutico de estas estructuras es la enzima glucosamina-1-fosfato-acetiltransferasa (GlmU)

3. Los 38 compuestos fueron procesados de manera tal que pudieran ser utilizados para procesos de *docking* molecular. De ellos, sólo 31 demostraron ser biológicamente activos
4. Por otro lado, se obtiene de la base de datos *Protein Data Bank* (RCSB PDB) (www.rcsb.org/pdb/home/home.do) la cristalografía de la enzima, glucosamina-1-fosfato-acetiltransferasa, utilizada por Green y col. (2012) en su búsqueda de compuestos inhibidores de la misma.
GlmU, es una enzima bifuncional esencial para la síntesis de la pared bacteriana presente sólo en células procariontas (Anderson y col., 1987). Participa en la primera etapa de síntesis de peptidoglicano (copolímero formado por dos azúcares, N-acetil-glucosamina y ácido N-acetilmurámico, alternadas y unidas mediante enlaces β -1,4), acetila 1-fosfato de glucosamina y luego añade UDP para producir UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc).
5. Posteriormente, se procede al *docking* molecular con el grupo de prueba (31 estructuras) en el receptor biológico (GlmU) con la finalidad de encontrar una correlación entre las energías de interacción y la actividad biológica. De este procedimiento, se obtuvieron las 10 mejores conformaciones de interacción para cada compuesto
6. Con el fin de tener una mejor comprensión de las interacciones intermoleculares de cada compuesto, se descompuso la energía total de interacción respecto de los residuos (aminoácidos) que componen el sitio de interacción con el receptor
7. Por último, se logró obtener una correlación entre las energías de interacción y actividad biológica; teniendo en cuenta la suma de contribuciones energéticas de los distintos residuos del sitio de interacción (Figura 40)

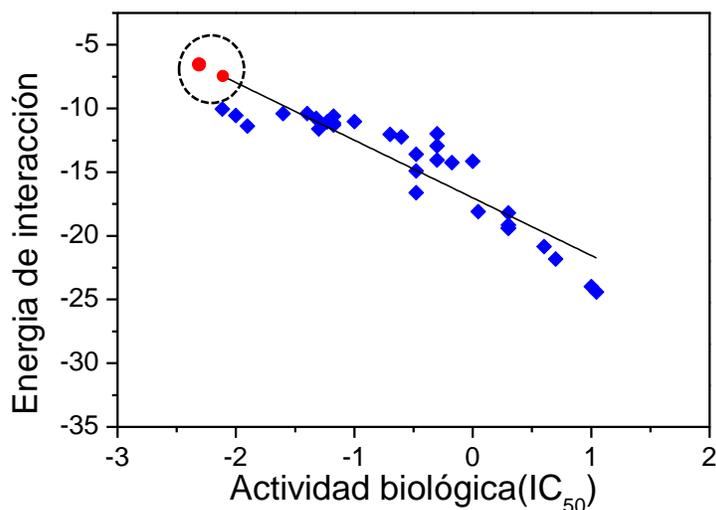


Figura 40. Correlación entre la actividad biológica y la energía de interacción con la enzima GlnU. En color azul \blacklozenge se detallan los resultados obtenidos con el grupo de prueba, mientras que en rojo \bullet se exhiben BS-THQ y 4-NH₂BS-THQ.

8. Una vez concretado estos pasos con el grupo de prueba y teniendo la información que corresponde las energías y actividad biológica, se procede a aplicar el mismo procedimiento para los compuestos de interés, BS-THQ y 4-NH₂BS-THQ.

Los resultados obtenidos con BS-THQ y su análogo sustituido, están en concordancia con los datos que arrojó el grupo de prueba descrito por Green y col. (2012). Sin embargo, en la Figura 40 se observa que éstos (círculos rojos) no se encuentran dentro del rango de los compuestos más activos. Esta diferencia se atribuye a que los experimentos descritos, grupo de prueba, fueron realizados sobre la enzima GlnU mientras que para la presente tesis se hicieron en el microorganismo completo siendo mayores los valores de inhibición obtenidos en nuestros experimentos.

Los estudios descritos en este apartado han sido fruto de un trabajo interdisciplinario. Los experimentos en membranas miméticas se llevaron a cabo en el Instituto de Química de la Universidad de San Pablo, Brasil, bajo la dirección de Prof. Dr. Mauricio Da Silva Baptista y la supervisión de la Dra. Christiane Pavani. Por otro lado, los estudios teóricos fueron realizados por los Dres. Sergio Ribone y Alfredo Quevedo del grupo de Química Medicinal Computacional de la FCQ, UNC.

Los resultados *in vitro* obtenidos, han demostrado, en primera instancia, de 16 compuestos de la quimioteca, seleccionados inicialmente, sólo 2 cumplieron con los requisitos de solubilidad y estabilidad en solventes compatibles con los ensayos biológicos a realizar. Tanto, 4-NH₂BS-THQ como BS-THQ son compuestos bactericidas

frente a cepas de relevancia clínica, siendo el primero de amplio espectro y mostrando valores de CIM inferiores al prototipo.

Las estructuras evaluadas afectaron notablemente el metabolismo redox de las cepas de *S. aureus*, exhibiendo los máximos valores en la generación de especies reactivas. Por su parte, *E. coli* reveló elevación sólo de ERO mientras que en *P. aeruginosa* se observó sólo una producción mínima de ERN, probablemente, estos efectos en las cepas Gram negativas se deben a estrategias de detoxificación propias de cada cepa. La evaluación de la inducción de la enzima SOD, permitió corroborar la producción de radical anión superóxido y la generación de especies reactivas perjudiciales para la célula. Así se confirma, nuevamente, que los compuestos bactericidas inducen estrés oxidativo como parte de su mecanismo de acción.

Como parte del estudio de la actividad antibacteriana y la generación de estrés oxidativo vinculado a la muerte bacteriana, se determinó por micrografías el daño que ambos compuestos causaban en las células. Se visualizaron modificaciones en las membranas, que fueron desde rugosidad, retracciones, desprendimiento de la membrana externa y hasta algunas presentaron lisis celular. Así, se corroboró el daño celular post tratamiento que lleva a la letalidad de estas especies.

Durante etapas avanzadas del desarrollo experimental descripto, se evaluó el efecto de ambos derivados sobre membranas miméticas (liposomas) con la finalidad de comenzar la búsqueda de un potencial target para estos compuestos. Se concluyó que ambas estructuras interaccionan con las membranas lipídicas ocasionando una perturbación inferior al 30% respecto del control. Esto se debería a que son moléculas pequeñas y altamente lipofílicas, de acuerdo con los valores predichos por las bases de datos MOLINSPIRATION® y OSIRIS®. Sin embargo, no provocaron una desestabilización total de la membrana después de 21 h de exposición, por lo cual se determinó que su efecto no es de tipo surfactante. Estos datos son relevantes, debido a que los experimentos indicarían que existe, al menos, un sitio blanco específico sobre el que actuarían.

En la etapa final, se realizó una búsqueda de targets por similitud estructural con nuestros derivados y se encontró que uno posible sería la enzima “GlmU” encargada de la primera etapa de la síntesis del polímero peptidoglicano, que constituye la pared celular bacteriana. Se obtuvo una correlación favorable entre la actividad biológica y las energías de interacción de estos derivados con el receptor, catalogando a esta enzima como una plausible diana terapéutica. La Figura 41 resume un modelo de trabajo que

se realizó a lo largo de la búsqueda de respuestas frente al objetivo específico previamente planteado.

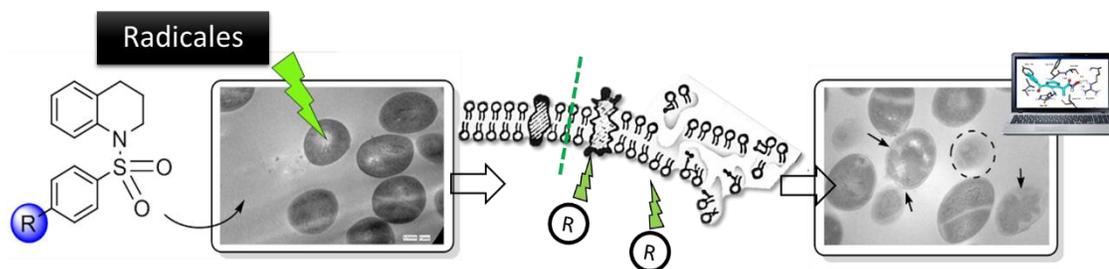


Figura 41. Ilustración de las etapas de búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana. Tanto BS-THQ como el derivado amino sustituido presentaron actividad bactericida frente a cepas de relevancia clínica, con un consecuente aumento de estrés oxidativo. El estrés revelado indujo lesiones en macromoléculas, a nivel de membrana y proteínas. Estudios en membranas miméticas y teóricos, permitieron descartar un mecanismo de acción inespecífico y plantear un potencial blanco para los derivados.

De esta sección de tesis surgió la siguiente publicación científica: “Evaluation of Antibacterial Activity and Reactive Species Generation of N-Benzenesulfonyl Derivatives of Heterocycles”. Martínez SR, Miana GE, Albesa I, Mazzieri MR, Becerra MC. *Chem Pharm Bull.* **2016**; 64:135-41.

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo de tesis se estudió la acción de diferentes sustancias antibióticas sobre el metabolismo oxidativo en bacterias productoras de biofilms y en estado planctónico, de manera tal, que se obtuvieron las siguientes conclusiones a partir de los resultados obtenidos.

- ∂ Se evidenció el efecto de LZD como un potente agente anti-biofilm a concentraciones reducidas (10xCIM) frente a cepas de *S. aureus* sensibles y resistentes a meticilina provenientes de aislamientos clínicos
- ∂ No se apreció generación de especies reactivas nocivas en biofilms maduros expuestos a LZD. Asimismo, el estudio de la acción de LZD en cepas planctónicas de *S. aureus* evidenció valores bajos de producción de especies reactivas sólo en un 40% de las cepas. Esto nos permitió corroborar que el estrés oxidativo en bacterias no tiene un rol principal ligado a la acción inhibitoria del agente bacteriostático LZD
- ∂ Se comprobó que el desequilibrio oxidativo puede generarse en el tratamiento con compuestos bactericidas induciendo lesiones oxidativas perjudiciales. La evaluación de la PL en tiempo real reveló que el deterioro oxidativo en membranas es un evento heterogéneo entre las células inducido por CIP
- ∂ Se demostró que el estrés oxidativo es parte del mecanismo de acción de CIP, debido a que la adición de un agente antioxidante externo lleva a la atenuación del efecto bactericida y en consecuencia aumentaría la sobrevida bacteriana
- ∂ Se describió la actividad antimicrobiana de nuevos derivados de síntesis y la alteración del equilibrio oxidativo bacteriano como parte de su mecanismo de acción

PROYECCIONES

En base a los resultados obtenidos durante el trabajo de tesis se plantea continuar con los siguientes estudios:

- ∂ Avanzar con el análisis de potenciales blancos de los derivados BS-THQ mediante la realización de ensayos biológicos con la enzima GmlU
- ∂ Por otra parte, se proyecta plantear un potencial modelo matemático que permita describir cuántos radicales peroxilo se producen y mapear con una alta resolución en que región puntual se oxida cada molécula del colorante H₂B-PMHC en la membrana de *E. coli* para luego a través de super resolución, estudiar la dinámica de evolución de los ERO como parte del metabolismo celular
- ∂ Seguir profundizando en el estudio de la inducción de la PL en tiempo real, tanto en células individuales como en biofilms, inducida por otros compuestos con actividad bactericida

MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

8.1.1 Condiciones de cultivo

Los cultivos se conservaron a -80 °C en caldo tripteína soya (TS) y glicerol en la relación 90:10. Para los experimentos, las cepas se cultivaron por 18 h a 35°C, *Escherichia coli* en agar Luria Bertani (LB) y el resto de las cepas en agar tripteína soya (TS). Los cultivos frescos se prepararon a partir de una única colonia aislada proveniente de un cultivo puro.

8.1.2 Cepas bacterianas utilizadas para la investigación de la generación de estrés oxidativo por parte del antibiótico Linezolid

Se estudió de la generación de estrés oxidativo inducida por el antibiótico Linezolid (LZD) en cultivos planctónicos. En estos experimentos se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus* de referencia sensibles y resistentes a meticilina, SAMS ATCC 29213, SAMR ATCC 43300. Además, se investigó la inducción de estrés oxidativo en cepas clínicas sensibles y resistentes a meticilina caracterizadas genéticamente¹ (Tabla 1). La tabla 1 detalla la cantidad de cepas estudiadas, las cuales se identifican numéricamente y la clasificación de acuerdo con la sensibilidad o resistencia a meticilina. El complejo clonal es una agrupación tipo secuencial de los genes housekeeping que determinan características genéticas o de virulencia entre las cepas. Por su parte el cassette cromosomal o SCCmec hace referencia a un elemento genético móvil siendo exclusivo de *S. aureus*, el cual es un determinante que le confiere resistencia a los antibióticos de tipo betalactámicos. Mientras que la categoría molecular indica si estos fueron adquiridos en la comunidad (CA) o en el ambiente hospitalario (HA).

¹ Cepas provistas por la Prof. Dra. Claudia Sola del Dpto. Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET.

Tabla 1. Cepas caracterizadas genéticamente: denominación numérica, sensibilidad a meticilina, complejo clonal, cassette cromosomal y categoría molecular (Izquierda a derecha).

CEPAS	SAMR/SAMS	Complejo clonal	Tipo de SCCmec	Categ. Molecular
1	SAMR	5	II	HA-SAMR
2	SAMR	8	IIIA	HA-SAMR
3	SAMR	5	IV	CA-SAMR
4	SAMR	8	IV	CA-SAMR
5	SAMR	30	IV	CA-SAMR
6	SAMR	5	IV	HA-SAMR
7	SAMR	8	IV	CA-SAMR
8	SAMR	8	IV	CA-SAMR
9	SAMR	22	IV	HA-SAMR
10	SAMR	30	II	HA-SAMR
11	SAMR	121	V	CA-SAMR
12	SAMR	251	XI	LA-SAMR
13	SAMS	5	SAMS	SAMS
14	SAMS	30	SAMS	SAMS
15	SAMS	8	SAMS	SAMS
16	SAMS	1	SAMS	SAMS
17	SAMS	8	SAMS	SAMS
18	SAMS	398	SAMS	SAMS
19	SAMS	45	SAMS	SAMS
20	SAMS	97	SAMS	SAMS
21	SAMS	1	SAMS	SAMS
22	SAMS	121	SAMS	SAMS
23	SAMR	5	SAMS	SAMS
24	SAMR	5	I	HA-SAMR
25	SAMS	5	SAMS	SAMS
26	SAMS	5	SAMS	SAMS
27	SAMR	5	IV	CA-SAMR
28	SAMR	5	IV	CA-SAMR

8.1.3 Estudios en cultivos planctónicos con el antibiótico bactericida ciprofloxacina

La investigación de las lesiones oxidativas inducidas por ciprofloxacina (CIP) fueron realizadas en las siguientes cepas bacterianas: *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, una cepa clínica de *P. aeruginosa* designada como H, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, SAMS ATCC 29213 y SAMR ATCC 43300.

8.1.4 Investigación de la susceptibilidad bacteriana en cultivos planctónicos a nuevos derivados de síntesis

Por su parte, la etapa de búsqueda de nuevas drogas con actividad antibacteriana se realizó en las cepas de referencia SAMS ATCC 29213, SAMR ATCC 43300, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

8.2 Síntesis de derivados de N-bencenosulfonilos de heterociclos

La síntesis de derivados de N-bencenosulfonilos de heterociclos (BS-Het) fue realizada de acuerdo con la metodología utilizada por Congreve y col. (2008) por el equipo de Química Medicinal del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Los métodos de purificación y la caracterización estructural de los derivados han sido previamente descritos por Pagliero y col. (2010).

8.3 Preparación de soluciones de LZD, CIP, BS-THQ y 4-NH₂BS-THQ

El antibiótico LZD se solubilizó en buffer PBS, el antibiótico CIP en H₂O y posteriormente diluido en PBS. En el caso de los derivados de síntesis, una solución madre de BS-THQ se preparó en una mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenglicol 400 (PEG) y buffer PBS en la proporción 20:10:70; el compuesto 4-NH₂BS-THQ se disolvió en una mezcla 10:90 (v/v) de metanol (MeOH) y PBS. La concentración final de solvente orgánico fue inferior al 10% en todos los experimentos.

8.4 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en los respectivos inóculos bacterianos fue cuantificada por el método de Bradford (Bradford *et al.*, 1976). El fundamento es el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a la interacción de aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas se mide espectrofotométricamente a 595 nm. Para determinar la concentración de proteínas de la muestra problema se construyó una curva de calibrado, a partir del suero patrón Proti 2 (Wiener Lab). La concentración de las muestras problema fueron determinadas por interpolación de los valores de absorbancia en la curva de calibrado, adicionando 100 µL de la suspensión bacteriana, 50 µL de buffer PBS y 50 µL del reactivo de Bradford.

8.5 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en células planctónicas

La CIM se evaluó mediante el método de macro-dilución en caldo siguiendo las normas internacionales propuestas por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). El inóculo bacteriano se preparó colocando cuatro o cinco colonias de cada cepa en caldo Müeller Hinton (MH) y se comparó la turbidez con el tubo 0,5 de la escala de *Mc Farland*.² Finalmente, se diluyó para ajustar el inóculo a 10^6 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de solución (UFC/mL). Soluciones madres de los antibióticos LZD (32 µg/mL) y CIP (10 µg/mL) se prepararon en PBS y caldo MH. En el caso de los derivados de síntesis se preparó una solución madre de BS-THQ (400 µg/mL) en una mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenglicol 400 (PEG), y caldo MH en la proporción 20:10:70; mientras que el compuesto 4-NH₂BS-THQ (200 µg/mL) se disolvió en una mezcla 20:80 (v/v) de metanol (MeOH) y caldo MH. La concentración final de solvente orgánico fue inferior al 10% en todos los experimentos. Las soluciones respectivas se incubaron, en diferentes concentraciones, con el inóculo bacteriano correspondiente por 18 h a 35°C. Los controles sin antimicrobianos se realizaron paralelamente. Los tubos se examinaron luego de ser incubados 18 h a 35 °C y se determinó la CIM para cada microorganismo evaluado.

8.6 Curvas de muerte bacteriana

Los cultivos bacterianos de *S. aureus* ATCC 29213, SAMR ATCC 43300, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27856, en fase de crecimiento exponencial, se suspendieron en caldo MH hasta alcanzar aproximadamente 10^8 UFC/mL ($DO_{600} \approx 0,1$), y se ajustó el inóculo a 10^6 UFC/mL mediante la dilución correspondiente. Luego, se incubaron las muestras con BS-THQ (1xCIM) y 4-NH₂BS-THQ (2xCIM). Los recuentos de viabilidad bacteriana se realizaron a las 0, 4, 8, 10 y 24 h de incubación a 35 °C. Se recolectaron alícuotas de 100 µL de cada muestra y se realizaron diluciones seriadas 1/10 en caldo MH, para su posterior siembra en placas de agar MH, mediante la técnica de siembra por microgota (Naghili y col., 2013). Las curvas de letalidad se construyeron representando gráficamente el \log_{10} de UFC/mL, en función del tiempo.

8.7 Ensayos en biofilm

8.7.1 Cepas bacterianas

Los ensayos de biofilms se realizaron en cepas de *S. aureus* procedentes de aislamientos clínicos (cinco) provistas por el Sanatorio Aconcagua de la ciudad de Córdoba Capital, Argentina. De éstas, cuatro fueron meticilino resistentes y se las

² *Mc Farland*: estándares de turbidez que se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber que el número de bacterias por mililitro de solución.

designó numéricamente SAMR 1, SAMR 2, SAMR 3 y SAMR 4; y sólo una fue meticilino sensible, SAMS 5. También, se utilizaron dos cepas de referencia SAMS ATCC 29213 y SAMR ATCC 43300 en este estudio.

8.7.2 Inducción de la formación de biofilm

A partir de cultivos frescos (ítem 8.1) se realizó una dilución en caldo para ajustar la concentración del inóculo bacteriano a $DO_{600} \approx 0,1$, turbidez semejante a 1.10^8 UFC/mL. Para inducir la formación de biofilm, se suplementó el caldo TS con glucosa a una concentración final de 0,25% p/v. Luego, al caldo suplementado, se adicionó la suspensión bacteriana hasta alcanzar una concentración final de 1.10^6 UFC/mL. Se agregaron 200 μ L de esta solución a cada pocillo de la placa de poliestireno estéril y se incubó por 24 h a 35 °C con agitación permanente (130 rpm). Posteriormente, se descartó el sobrenadante de la placa y se lavó cada pocillo 3 veces con 200 μ L de buffer PBS para eliminar las células planctónicas (Aiassa y col., 2014).

8.7.3 Cuantificación de la masa de biofilm con la tinción con Cristal Violeta (CV)

El método utilizado para la determinación de la masa de biofilm fue la tinción con CV. Este colorante interacciona con las cargas negativas de la superficie de la matriz extracelular del biofilm, así como también con la pared de las células planctónicas. Tanto las células viables, las muertas y la matriz pueden teñirse con CV, por lo que éste es sólo una medida de la cantidad de masa del biofilm (Xu y col., 2016). Posterior a la inducción del biofilm, y remoción del sobrenadante, la placa de poliestireno se introdujo en cabina de flujo laminar o estufa de cultivo por 12 h, para el secado. Luego, se añadieron 200 μ L de una solución de CV al 1% a cada pocillo y se dejó reposar durante 15 min. Finalmente, se lavó el exceso de CV dos veces con PBS y se fijó el colorante con 50 μ L de etanol al 95% durante 15 min. Se midió la absorbancia a 595 nm (Pitts y col., 2003).

8.7.4 Determinación del perfil inhibitorio de LZD en biofilm preformados

La inducción de biofilms de las cepas *S. aureus* se realizó en placas de poliestireno estériles de 96 pocillos. Una vez obtenido el biofilm maduro se descartó el sobrenadante y la placa se enjuagó 3 veces con PBS. Paralelamente, se prepararon soluciones del antibiótico en caldo TS a partir de una solución stock de LZD en PBS, las concentraciones ensayadas fueron 10xCIM, 100xCIM, 500xCIM. Posterior al último enjuague, se adicionaron 200 μ L de la solución de antibiótico y se incubó la placa por 24 h a 35 °C en shaker con agitación continua a 130 rpm (Martínez y col., 2016). Finalmente, para evaluar la masa de biofilm se utilizó el ensayo con CV (ítem 8.7.2).

8.7.5 Estudio de la actividad metabólica del biofilm

La formación e inhibición de biofilm se midió indirectamente de forma semicuantitativa colorimétrica usando un ensayo de reducción de 2,3 bis (2 metoxi-4-nitro-5 sulfofenil) 2H tetrazolio, 5 carboxanilida (XTT) y meta sulfato de fenazina (PMS). El fundamento radica en la reducción de la sal de tetrazolio a su forma soluble en agua (Roehm y col., 1991). Se mide espectrofotométricamente a 490 nm y la absorbancia que arroja es indicativa de la masa de células metabólicamente activas. El ensayo permite la cuantificación de células viables tanto en biofilm como cultivos planctónicos (Gabrielson y col., 2002). En primer lugar, se evaluó el crecimiento del biofilm por este ensayo, para determinar cuáles cepas eran las mayores productoras. Se indujo la formación de biofilm en placas de poliestireno de acuerdo con el ítem 8.7.1 y se midió la actividad metabólica a las 0, 4, 6, 12 y 24 h. A cada tiempo evaluado se descartó el sobrenadante, enjuagó el biofilm (3 veces), se agregaron 250 μL de la solución del colorante (XTT/PMS) y se incubó en oscuridad por un período de 3 h a 35°C. Ambos reactivos (XTT/PMS) se diluyeron en 100 μL de DMSO (0,01% en la solución final) y las soluciones se realizaron en PBS a las concentraciones finales de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (XTT) y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (PMS). El mismo procedimiento se siguió para evaluar la inhibición del biofilm preformado cuando fue expuesto a LZD.

8.7.6 Investigación de la producción de especies reactivas inducidas por LZD en cepas de *S. aureus* productoras de biofilms

La molécula 1,2,3 dihidrorodamina DHR (Figura 1) en presencia de ERO y ERN se oxida a su forma fluorescente HR (especie catiónica y altamente lipofílica). Esta se excita a 505 nm y emite a la longitud de onda de 530 nm (Gomez y col., 2006). La formación de biofilm para cada cepa se estimuló de acuerdo con lo descrito en el ítem 8.7.2 El biofilm preformado, sobre una placa de poliestireno negra, de 96 pocillos con fondo plano transparente, se lavó 3 veces con buffer PBS estéril. Luego se adicionaron 200 μL de una solución de LZD, a las concentraciones de 10xCIM y 100xCIM, y la placa se incubó por 2, 4, 6, y 10 h a 35°C. Una vez concluido el período de incubación, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 180 μL de PBS más 20 μL de una solución de DHR (la concentración final de colorante en cada pocillo fue de 1 μM). Las muestras tratadas se incubaron por 20 min en estufa de cultivo en condiciones de oscuridad a 35°C. La intensidad fluorescente emitida se realizó en lector de microplacas Synergia Biotek.

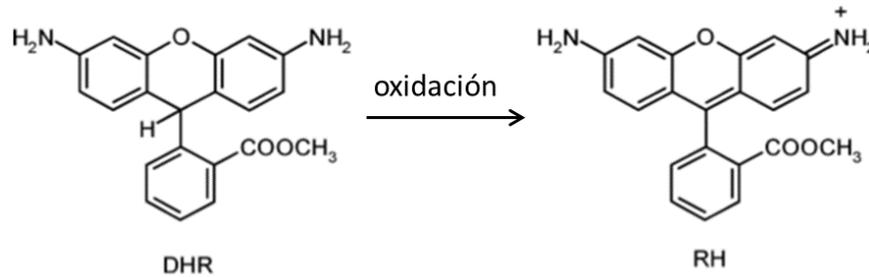


Figura 1. Oxidación de la molécula no fluorescente DHR a su especie fluorescente HR.

8.7.7 Estudio de la eficacia de Linezolid en la erradicación del biofilm formado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis de la erradicación de biofilm se realizó por microscopía electrónica de barrido. Esta técnica es capaz de producir imágenes tridimensionales de la superficie de una muestra con una alta resolución. Se indujo la formación de biofilm de las cepas SAMR 1 y SAMR ATCC 43300 sobre cubreobjetos de vidrio. Posterior a la obtención de un biofilm maduro sobre la superficie del cubreobjetos, éste se lavó reiteradas veces con PBS y finalmente se trató con LZD a la concentración de inhibición (10xCIM), determinada previamente por el ensayo de actividad metabólica. La eficiencia de erradicación se evaluó a las 0, 12, 18 y 24 h de contacto con el antibiótico. Luego de cada tratamiento, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con el buffer de trabajo y se deshidrataron con soluciones de EtOH: H₂O de concentración creciente (50, 70, 80, 90 y 100 %). Finalmente, cada muestra (vidrio) se recubrió con oro y se capturaron imágenes utilizando el microscopio Carl Zeiss Sigma del laboratorio de Microscopía y Análisis por Rayos X (LAMARX) de la UNC (Kontensk y col., 2010).

8.7.7.1 Análisis de imágenes obtenidas por SEM mediante Fiji-ImageJ

Las imágenes obtenidas por SEM fueron procesadas con el software Fiji-ImageJ (Schindelin y col., 2012), éste es de dominio público. Se eligieron 8 micrografías representativas obtenidas de cada tratamiento. Éstas se alinearon y escalaron (nm), obteniéndose una superficie total de 2769 mm². Para poder diferenciar la superficie de biofilm del fondo de la imagen se aplicó un filtro (*median filter*) no lineal que elimina el ruido de la imagen (Carson y col., 2010). Inmediatamente después, la imagen se convirtió en binaria (blanco y negro, donde asigna valores de 0 y 255 para cada pixel, respectivamente) aplicando el *threshold Otsu* por *default*. Luego se cuantificó la totalidad de superficie ocupada por el biofilm para la imagen binaria. Finalmente, se realizó la sustracción (área biofilm) correspondiente a la totalidad de la superficie y así se obtuvo el valor correspondiente al porcentaje de ocupación sobre la superficie. En paralelo, se realizó un *script* con la finalidad de automatizar el análisis de las imágenes (Martínez y col., 2016).

8.8 Estudio de la inducción de ERO y ERN en cultivos planctónicos

8.8.1 Evaluación de la generación de radical anión superóxido $O_2^{\bullet-}$ mediante la reducción del azul de nitrotetrazolio

La prueba del azul de nitrotetrazolio (NBT) se basa en la reducción del reactivo NBT oxidado (incolore) a su forma reducida NBTH (Figura 2), el cual produce un precipitado de color azul que puede cuantificarse por métodos espectrofotométricos. En primer lugar, se prepararon cultivos bacterianos de SAMS ATCC 29213, SAMR ATCC 43300, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 en caldo TS (18 h a 35°C), cada suspensión bacteriana ($DO_{600} \approx 1$) se centrifugó y resuspendió en PBS a pH=7. En segundo lugar, se incubaron 50 μ L de las suspensiones, con 50 μ L de BS-THQ o 4-NH₂BS-THQ, en concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM (2 h a 35°C). En tercer lugar, se adicionaron 50 μ L del reactivo NBT (1 mg/mL, solubilizado en 100 μ L de DMSO y 900 μ L PBS) y se incubaron en oscuridad por 30 min a 35°C, y posteriormente se adicionaron 10 μ L de HCl (0,1 N) con el propósito de detener la reacción química. Finalmente, se centrifugaron las muestras por 10 min a 1500 rpm para separar las células del sobrenadante (ERO extracelular). Para extraer el NBTH (ERO intracelular), los sedimentos se suspendieron en 160 μ L de PBS y se trataron con 40 μ L de DMSO, con el fin de lisar las células. La solución del NBTH, se midió espectrofotométricamente a 575 nm, en un lector de placas multipocillos Biotek (Becerra y col., 2002).

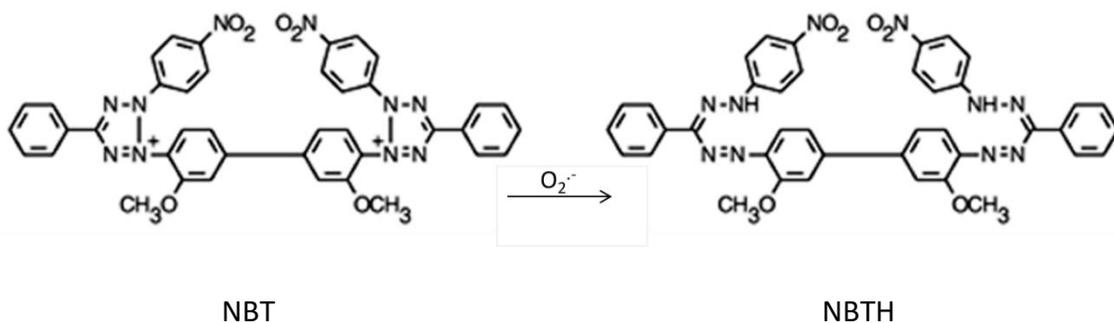


Figura 2. Reducción de NBT a su forma reducida NBTH

8.8.2 Evaluación de la producción de ERN

La producción de óxido nítrico (ON), en SAMS ATCC 29213, SAMR ATCC 43300, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 se determinó mediante la cuantificación de nitritos utilizando la reacción de Griess. Su fundamento se basa en la formación de un cromóforo por la reacción de sulfanilamida con nitrito de sodio en medio ácido, seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas, tales como el

clorhidrato N-1-(naftil) etilendiamina, que producen la formación del azo derivado coloreado, que se determina por espectrofotometría a 540 nm. Los cultivos bacterianos se obtuvieron en caldo MH (24 h a 35°C) y se trataron de la misma manera que para la determinación del anión superóxido. Cada suspensión se incubó con BS-THQ o 4-NH₂BS-THQ por un periodo de 2 h, en volúmenes 1:1. Subsiguientemente, las muestras se centrifugaron por 10 min a 3000 rpm, y se lavaron 2 veces con buffer PBS. Se tomó 100 µL de las muestras tratadas, y se adicionó, en primer lugar, 50 µL del reactivo sulfanilamida (2 % p/v en HCl 5 % v/v) más 50 µL del clorhidrato de N-1-naftil etilendiamina (NEED 0,1% P/V en agua). Estas soluciones fueron incubadas en oscuridad por 30 min, a 35°C. Al mismo tiempo, se hizo una curva de calibrado con nitrito de sodio (NaNO₂) en concentraciones de 0,8 a 400 µM en PBS. Los resultados se expresaron como µM NaNO₂/mg proteína. Las proteínas fueron cuantificadas mediante el ensayo de Bradford como se describe en el ítem 8.4.

8.8.3 Detección de ERO y ERN mediante microscopía de fluorescencia

Utilizando la técnica de microscopía de fluorescencia se cuantificó la producción, en general, tanto de ERO como de ERN: O₂^{•-}; OH[•]; H₂O₂; NO[•]; NO₂[•] (Wrona y col., 2005). Los colorantes fluorescentes presentan la capacidad de oxidarse o reducirse frente a diversas especies reactivas y emitir fluorescencia. El colorante fluorescente diacetato 2',7'-dicloro-hidrofluoresceína (H₂DCFDA) se oxida mediante ERO y ERN, excitándose a 490 nm y emitiendo luz a 520 nm (Melino y col., 1990; Reiniers y col., 2017). La sonda H₂DCFDA permitió evaluar la generación de especies reactivas (Figura 3), ya que presenta la capacidad de oxidarse y emitir fluorescencia a 520 nm (Culakova y col., 2013). En caldo MH (10 mL) se prepararon cultivos frescos de las cepas SAMS ATCC 29213 y SAMR ATCC 43300 por 18 h a 35 °C (DO₆₀₀≈1), los cuales se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min y se procedió a re suspender los pellets en PBS (5 mL). Las suspensiones bacterianas de las cepas estudiadas fueron incubadas con BS-THQ a concentraciones supra-CIM, CIM y sub-CIM por un periodo de 2 h a 35°C. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 min y lavadas con PBS. Se recolectaron alícuotas de 100 µL de las muestras, a las cuales se les adicionó 1,8 mL de PBS más 20 µL de la solución de H₂DCFDA (100 µM) y posteriormente se las incubó, en oscuridad por 25 min a 35°C. La intensidad fluorescente se obtuvo mediante la excitación de las muestras a 490 nm y recolectando la emisión fluorescente a 520 nm, utilizando un microscopio NIKON TE-2000U. En paralelo, se realizaron controles positivos con CIP y negativos con las cepas no tratadas.

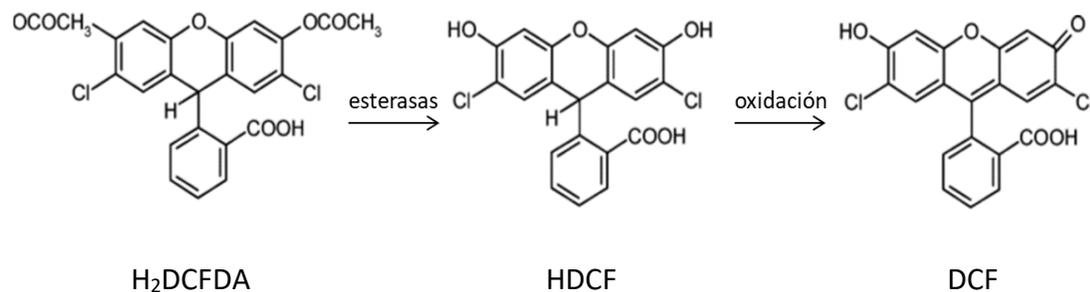


Figura 3. La sonda H_2DCFDA es degradada por esterasas una vez que ingresa a la célula pasando a su forma HDCF la cual en presencia de ERO y ERN es oxidada a la especie emisora DCF .

8.8.4 Detección de ERO y ERN mediante espectrofluorimetría con H_2DCFDA

En caldo MH (10 mL) se prepararon cultivos frescos de las cepas SAMS ATCC 29213, SAMR ATCC 43300, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 por 18 h a 35 °C ($\text{DO}_{600} \approx 1$), los cuales se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min y se procedió a resuspender los pellets en PBS (5 mL). Las soluciones del BS-THQ y 4-NH₂BS-THQ, se disolvieron en las mezclas de solventes descritas previamente en el rango de concentraciones finales de 200 a 12,5 µg/mL. En una microplaca negra, de poliestireno de 96 pocillos, con fondo plano transparente, se incubaron 100 µL de los inóculos bacterianos con 100 µL de los derivados de síntesis (2 h a 35 °C). La prueba fluorescente H_2DCFDA se solubilizó en DMSO y se prepararon soluciones stock de 10 mM, las cuales luego fueron diluidas en PBS para lograr una concentración final de 1 µM, en el pocillo de la microplaca. A cada muestra se le adicionó 20 µL de la sonda, se incubó por 20 min, en estufa de cultivo, en condiciones de oscuridad y a 35 °C. La intensidad fluorescente emitida se recogió en lector de microplacas Synergia Biotek. Paralelamente, se realizaron controles de las muestras no tratadas con los derivados de síntesis y también controles positivos con H_2O_2 al 3% v/v como oxidante.

8.8.5 Detección de especies reactivas por espectrofluorimetría utilizando la sonda DHR

En caldo MH (10 mL) se prepararon cultivos frescos de las cepas de *S. aureus* y se incubaron por 18 h a 35 °C ($\text{DO}_{600} \approx 1$), los cuales se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min y se procedió a resuspender los pellets en PBS (5 mL). Paralelamente, se prepararon soluciones del antibiótico LZD en el rango de concentraciones finales entre 1 a 4 µg/mL. En una microplaca negra, de poliestireno, de 96 pocillos con fondo plano transparente, se incubaron 100 µL de los inóculos bacterianos con 100 µL de diferentes concentraciones de LZD por 4 h y 24 h a 35 °C. Posterior al período de incubación, se añadieron 20 µL de la sonda DHR (concentración final 1 µM, solubilizada en 100 µL de DMSO y PBS) más 80 µL de PBS y se conservó en oscuridad por 20 min a 35 °C. La intensidad fluorescente se midió en un lector de microplacas Synergia Biotek.

8.9 Cuantificación de la producción de especies reactivas en glóbulos blancos

Se obtuvieron leucocitos de muestras de sangre periférica de donantes sanos y fue anticoagulada con heparina. Luego, se agregaron 4 mL de dextrano al 6% p/v en buffer PBS a 10 mL de la sangre y se mantuvieron en contacto por 30 min a temperatura ambiente, para sedimentar los glóbulos rojos. Una alícuota de 2 mL de solución de Ficoll-Hypaque se agregó a 6 mL de la solución anterior y se centrifugó para lograr la separación por gradiente de tamaño celular. De esta manera, se obtuvo una solución trifásica, conteniendo en la parte superior plasma, la fase intermedia glóbulos blancos y la inferior hematíes. Se extrajo con pipeta Pasteur el contenido de la fase intermedia y se agregó albumina 0,1% p/v. El recuento de leucocitos se realizó por microscopía óptica con un aumento 40x, en una cámara de Neubauer. Luego, se realizó un promedio del recuento y se ajustó la solución a un volumen final con buffer para lograr una concentración de $1 \cdot 10^6$ /mL células (Aiassa y col., 2016). Finalmente, se incubaron 60 μ L de la solución de leucocitos con 60 μ L de diferentes soluciones de LZD (50; 1; 0,1 y 0,05 μ g/mL) por 20 y 40 min a 37 °C. Por último, se adicionaron 60 μ L de buffer PBS y 20 μ L de la sonda 1,2,3 DHR a una concentración final de 1 μ M. Las muestras se incubaron por 20 min a 35 °C, en estufa de cultivo, y en oscuridad. La intensidad fluorescente emitida se recogió en lector de microplacas Synergia Biotek. La fluorescencia (unidades arbitrarias) se cuantificó excitando las muestras a 505 nm, la emisión se recolectó a 530 nm.

8.10 Investigación de la actividad hemolítica

Se evaluó la capacidad de LZD de producir hemólisis en glóbulos rojos obtenidos de sangre periférica humana proveniente de adultos sanos; posterior a la extracción se añadió EDTA como agente anticoagulante. Inmediatamente, las muestras fueron centrifugadas por 10 min a 2000 rpm y lavadas tres veces con buffer PBS. El pellet se suspendió en PBS para alcanzar una concentración de 10% (v/v) eritrocitos/suspensión PBS. La suspensión se diluyó en PBS (1:10) y se tomaron alícuotas de 100 μ L, las que fueron incubadas con 100 μ L de LZD (50; 1; 0,1 y 0,05 μ g/mL) en PBS por 1 y 2 h a 35 °C. Las muestras incubadas se centrifugaron por 10 min a 2000 rpm; del sobrenadante se transfirieron 150 μ L a una placa de poliestireno transparente y se midió la absorbancia a 450 nm (Ahmad y col., 2010). Como control positivo de hemólisis total se adicionó Tritón X-100 al 1% (v/v). El porcentaje de hemólisis se calculó mediante la siguiente ecuación:

% hemólisis = $[(A_{450} \text{ muestra tratada con LZD} - A_{450} \text{ control}) / A_{450} \text{ muestra hemolizada con Tritón X-100}] \times 100$

8.11 Evaluación sistemas antioxidantes

8.11.1 Cuantificación de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD)

Para la determinación de la actividad SOD se utilizó riboflavina, la cual pierde un electrón en presencia de luz y desencadena una serie de reacciones que generan radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este reduce el reactivo azul de nitrotetrazolio (NBT) azul de formazán, generando un precipitado azul que se mide por método colorimétrico. La reducción de NBT, por lo tanto, disminuye en presencia de SOD, ya que esta enzima dismuta el radical anión superóxido conduciendo a la formación de H_2O_2 . Las cepas se obtuvieron a partir de cultivos frescos en caldo MH por 18 h a 35°C ($DO_{600} \approx 1$). Posteriormente, se centrifugaron y suspendieron en PBS. Se incubaron 500 μ L de las suspensiones con 500 μ L de las soluciones de LZD ó 4-NH₂BS-THQ, por 2 y 4 h a 35°C. Después del periodo de contacto, las muestras se centrifugaron por 10 min a 3000 rpm. El sobrenadante se descartó y los respectivos pellets se solubilizaron con 250 μ L de PBS y luego se agregaron 250 μ L de DMSO para romper las membranas celulares. De este último tratamiento se tomaron alícuotas de 100 μ L a las cuales se les adicionó los reactivos en el siguiente orden: 300 μ L de metionina (39 mM); 300 μ L de EDTA (300 nM); 100 μ L de NBT (750 μ M) y 300 μ L de riboflavina (6 μ M). Por último, se expusieron las muestras a luz fluorescente (lámpara de 20 w) por 6 min para que se desencadene la reacción de la riboflavina. Paralelamente, se realizó un control positivo con H_2O_2 al 30% v/v, para determinar las unidades SOD del ensayo. La lectura del color final se determinó espectrofotométricamente a 595 nm (Misra y col., 1977). Los resultados fueron expresados como unidades de actividad SOD por mg de proteína (U SOD/mg proteína). La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford previamente descrito.

$$\text{Calculo \% activación de SOD} = \frac{(\text{control} - \text{muestra tratada}) * 100}{\text{Activación } H_2O_2}$$

8.11.2 Determinación de la capacidad antioxidante total (FRAP)

El ensayo FRAP mide el poder reductor de los antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos. La reducción del complejo de tripiridiltriazina férrica (Fe^{3+} TPTZ) a la forma ferrosa (Fe^{2+}), puede ser monitoreada espectrofotométricamente a 593 nm debido al complejo azul intenso que se forma. La reacción es inespecífica, cualquier sustancia presente en el medio de reacción que tenga un potencial de reducción menor, bajo las condiciones de la reacción, que aquel del medio de reacción férrico/ferroso, conducirá a la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} . El cambio en la absorbancia, entonces, está directamente relacionado al poder reductor total de los antioxidantes donantes de electrones presentes en la mezcla de reacción (Benzie y Strain, 1999; Aiassa y col., 2011). Los cultivos frescos de las cepas ($DO_{600} \approx 1$) se centrifugaron a 2000

rpm por 10 min y se procedió a re suspender los pellets en PBS. Paralelamente, se prepararon soluciones del antibiótico en el rango de concentraciones entre 1 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se utilizaron 10 μL del sobrenadante de cultivo, de cada una de las condiciones ensayadas con el antibiótico LZD, al cual se le agregó 300 μL de una mezcla de reactivos formada por: 10 partes de buffer acetato 300 mM de pH 3,6; una parte de solución de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y una de solución de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM. Se emplearon soluciones acuosas de concentraciones conocidas de Fe^{2+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) como testigos para realizar una curva de calibración y se determinó la absorbancia en un lector de microplacas a 595 nm. Los resultados se expresaron como $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ de proteína.

8.12 Estudio de las lesiones provocadas por las especies reactivas en macromoléculas bacterianas

8.12.1 Cuantificación del daño en macromoléculas bacterianas: productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP)

Los AOPP son considerados marcadores de estrés oxidativo (Witko-Sarsat y col., 1996), son indicativos de la existencia de proteínas altamente oxidadas. Los patrones espectrales de los AOPP corresponden a moléculas coloreadas dentro de las que se incluyen la ditirosina, carbonilos y pentosidinas (Capeillère-Blandin y col., 2004). Estos productos de oxidación avanzada pueden ser detectados por espectrofotometría a 340 nm, utilizando una solución de Cloramina T en presencia de yoduro de potasio (KI). Las diferentes cepas se cultivaron en caldo MH por 18 h a 35 °C, las cuales fueron centrifugadas a 3000 rpm y suspendidas en buffer PBS. Paralelamente, se prepararon soluciones de LZD (rango concentraciones 1 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y de los derivados de síntesis (rango concentraciones 12,5 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se incubaron alícuotas de 900 μL de las respectivas suspensiones bacterianas con 100 μL de las soluciones de LZD, BS-THQ, 4-NH₂BS-THQ o PBS (condición basal), por diferentes periodos de tiempo (0, 2, 4, 6 y 24 h). Se tomaron muestras de 200 μL de cada uno de los tratamientos, a los cuales se les adicionó 10 μL KI (1,16 M) y 20 μL de ácido acético glacial. Inmediatamente luego de la adición de los reactivos se realizó la lectura espectrofotométrica. Las concentraciones de AOPP se expresaron como miliequivalentes de Cloramina T por miligramo de proteína (mEq Cloramina T/mg proteína), por lo que se construyó una curva de calibrado con Cloramina T en el rango de concentraciones de 0 a 100 μM (rango de linealidad). Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford descrito en el punto 8.4.

8.12.2 Investigación de la inducción de la peroxidación lipídica en cepas Gram positivas y negativas expuestas a CIP

A partir de un cultivo puro, se tomó una colonia aislada y se cultivó aeróbicamente en caldo LB o TS (30 mL), a 35°C por 18 h, con agitación permanente (130 rpm). Posterior al lapso de incubación, se prepararon cultivos con $DO_{600} \approx 1$, se procedió a centrifugar a 4000 rpm durante 10 min y se lavó el pellet obtenido reiteradas veces (3) con buffer PBS pH 7. Por último, los sedimentos obtenidos se concentraron en 3 mL del buffer. Paralelamente, se prepararon soluciones stock de CIP (300 μ M), solubilizada en H₂O (1 mL) y PBS; el colorante H₂B-PMHC se solubilizó en DMSO para alcanzar una concentración de 15 μ M. En una placa de poliestireno, de 96 pocillos, negra, estéril con fondo plano transparente, se añadieron los siguientes volúmenes de cada solución respectivamente: 30 μ L de suspensión bacteriana, 150 μ L de PBS, 100 μ L de antibiótico y por último 20 μ L del colorante. Se procedió a realizar mediciones en un lector de microplacas excitando las muestras a 488 ± 10 nm y recogiendo la emisión a 520 ± 10 nm, cada 5 min durante 12 h. Los experimentos se llevaron a cabo a 35°C, se realizaron por cuadruplicado y se repitieron en 6 días independientes.

8.12.3 Seguimiento de la peroxidación lipídica (PL) generadas en células únicas por CIP y monitoreadas con H₂B-PMHC

Para los ensayos de seguimiento de PL en tiempo real, se diseñó una cámara de vidrio compuesta por un cilindro de vidrio adherido a un cubreobjetos del mismo material (25 x 25 mm). La cámara se inmovilizó a la platina del microscopio y se ajustó la temperatura a 37°C.

Para visualizar la fluorescencia de H₂B-PMHC, las muestras se excitaron con una onda evanescente proveniente del láser de diodo de 488 nm (Agilent Technologies, MLC-400B). El haz proveniente del láser se acopló al objetivo del microscopio utilizando un divisor de luz de banda (ZT488/640rpc, Chroma Technology). Además, la emisión de H₂B-PMHC se filtró espectralmente con un filtro de excitación (ET540/80, Chroma Technology). Para las imágenes de viabilidad celular, utilizando el marcador yoduro de propidio (IP), se pasó el haz del láser de 561 nm a través de un filtro de limpieza de multibanda (ZET405/488/561/647x, Chroma Technology). Las imágenes se obtuvieron enfocando el haz del láser colimado en el plano focal posterior del objetivo y utilizando aceite de inmersión (Nikon CFI SR Achromat TIRF 100x, NA = 1,51). La fluorescencia emitida por el colorante fue transmitida a través del mismo objetivo y se capturó en una cámara de carga acoplada (EM-CCD) iluminada por un multiplicador de electrones (Andor iXon Ultra DU-897). Paralelamente, se capturaron imágenes del canal diferencial de contraste de interferencia (DIC) con el mismo objetivo (100x) empleado para la obtención de imágenes de fluorescencia. Las potencias de los respectivos láseres de excitación se midieron a la salida del objetivo

utilizando el haz que se proyecta a través de la superficie del lente y fueron 0,098 mW para el láser de 488 nm y 0,077 mW para el de 561 nm.

La cepa *E. coli* ATCC 25922 se cultivó en agar LB durante 18 h a 35°C, luego se adicionaron 2 mL de buffer PBS a la placa de cultivo y se recogió la suspensión bacteriana fresca. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y el pellet se lavó con PBS 3 veces. Paralelamente, se prepararon soluciones stock de: CIP en buffer PBS (9, 90 y 300 μ M); H₂B-PMHC en DMSO (15 μ M); PMHC solubilizado en acetonitrilo y diluido en PBS (30 y 300 μ M) y para la identificación de células muertas se adicionó IP (1 μ M) solubilizado en DMSO y diluido en PBS (30 μ M).

La preparación de la muestra para ser estudiada por microscopía se acondicionó de la siguiente manera (volumen final de la cámara 600 μ L):

- 1- Se adicionaron 200 μ L de suspensión bacteriana a la cámara de vidrio, la cual se recubrió para evitar contaminación del ambiente. La muestra se dejó reposar por 20 min, luego se lavó, al menos, 40 veces con 1 ml de PBS. Por DIC se siguió la adherencia celular a la superficie del vidrio y la limpieza de la cámara.
- 2- En una etapa posterior, diferentes condiciones experimentales, se añadieron a la cámara en el siguiente orden: 200 μ L de antibiótico, PBS (el volumen fue acorde con el experimento realizado), 20 μ L de PMHC y finalmente 40 μ L de H₂B-PMHC.
- 3- Los experimentos de viabilidad celular se realizaron agregando 20 μ L de IP.
- 4- Se siguieron las muestras por un período de 12 h, adquiriendo imágenes en los canales correspondientes cada 30 seg.

8.12.3.1 Procesamiento de imágenes

Las imágenes se procesaron aplicando el software FIJI-ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>). Las imágenes correspondientes a una película de 12 h de adquisición (1441 tomas/película de 12 h) se alinearon y se seleccionó la última captura para la generación de una imagen binaria (blanco y negro, donde asigna valores de 0 y 255 para cada pixel, respectivamente). Dos procesos se aplicaron *Erode* y *Watershed*, el primero remueve pixeles de los bordes de la imagen para no cuantificar fondo y el segundo es una segmentación que permite separar partículas que se tocan, a las células individuales para corregir la imagen binaria y así obtener el centro iluminado de cada célula. Todos los bacilos se seleccionaron automáticamente empleando *Analyze particle*, así se logró conseguir una región de interés (ROI) para cada célula individual. Esta imagen se solapó con la imagen de referencia y se midió la intensidad media de grises para todas las imágenes capturadas (1441 tomas). Para determinar la intensidad de fondo, se hicieron círculos de 2 píxeles (donde cada pixel corresponde a un área de 160 x 160 nm) a lo largo de la imagen y se calculó el valor medio de gris para cada uno, posteriormente se utilizó como promedio para realizar la

sustracción correspondiente. Las imágenes DIC se procesaron, siguiendo el mismo esquema de trabajo, para contabilizar el número de células totales en el ensayo.

8.13 Estudio del daño oxidativo producido por BS-THQ o 4-NH₂BS-THQ en membranas miméticas: Ensayo de la liberación de 5, 6 carboxifluoresceína (CF)

El daño producido por los derivados de síntesis en membranas simuladas se evaluó a través de la fuga de la sonda fluorescente CF (Makrigiorgos y col., 1997; Bacellar y col., 2014), ésta se encontraba confinada a liposomas compuestos por distintos lípidos. Inicialmente, se prepararon soluciones en cloroformo de los siguientes lípidos: Lecitina de soja; DOPC (1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina); DOPE (1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina); DODAB (Dioctadecil dimetil bromuro de amonio); PG (1,2-diarachidonoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]) y también combinaciones de estos: DOPC: DODAB (80:20); DOPC:PG (80:20) y DOPC: DOPE (80:20). Una vez obtenidas las soluciones, se procedió a evaporar el solvente utilizando una corriente de Argón, con la finalidad de formar un film lipídico en las paredes del tubo de Kahn. En segundo lugar, se preparó una columna de Sephadex 50 que se compactó con H₂O miliQ y luego se hidrató con buffer Tris (10 mM) en NaCl (300 mM) a pH=8, y por último se saturó con la solución del lípido que se eluyó.

A continuación, los films de lípidos se dispersaron en 1 mL de la solución de CF (50 mM) preparada en buffer Tris (10 mM). Los films de un solo lípido se solubilizaron mediante agitación con vortex y sonicado en periodos de 10 min para obtener liposomas homogéneos en forma y tamaño. Para las combinaciones de lípidos se utilizó un sonicador de punta en un ciclo de 10 minutos de sonicado (0,3 min de sonicado y 0,3 min reposo). Como última instancia de la etapa preparativa de los liposomas, se procedió a correr las soluciones por la columna de Sephadex para separar el colorante CF libre del unido a los liposomas. La primera fracción que eluye en la columna es la CF confinada a los liposomas debido al tamaño superior de estos. Las soluciones de BS-THQ y 4-NH₂BS-THQ, en el rango de concentraciones entre 12,5 a 100 µg/mL se prepararon en DMSO: PBS (20:80). Para determinar el daño inducido en los lípidos, se utilizó una microplaca negra de 96 well, en la que se adicionaron: 7 µL de CF confinada en liposomas, 150 µL de las soluciones a estudiar y 143 µL de buffer Tris. La fluorescencia emitida se evaluó excitando las muestras a 480 nm y recogiendo la emisión a 517 nm cada 30 min por un periodo total de 6 h en un lector de placas TECAM-BioTek. Subsiguientemente, se preparó una solución de Tritón X-100 al 10% en H₂O miliQ de la cual se agregaron 10 µL a cada uno de los pocillos de la microplaca para romper los liposomas y obtener así el 100% de fluorescencia emitida. Paralelamente se realizaron los controles correspondientes con los solventes y buffers utilizados. Se determinó el porcentaje de liberación de CF mediante la siguiente fórmula:

$$\%CF_{\text{liberada}} = \frac{100 \% (I - I_0)}{(I_t - I_0)}$$

donde I es la intensidad fluorescente obtenida en cada punto, I_0 es la intensidad fluorescente inicial e I_t es el valor de fluorescencia final luego del tratamiento con TritonX-100.

8.14 Análisis del daño inducido por BS-THQ y 4-NH₂BS-THQ por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

S. aureus ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922 se cultivaron en caldo MH (24 h a 35°C), estas suspensiones bacterianas se diluyeron, para ajustar los inóculos a una concentración de 10⁸ UFC/mL (DO₆₀₀≈0,1). La suspensión de la cepa Gram positiva se trató con una solución de BS-THQ, solubilizada en una mezcla de DMSO y PEG 400, en la proporción 2:1, a la concentración sub-CIM de 150 µg/mL. La cepa Gram negativa se expuso al derivado sustituido, solubilizado en MeOH, a la concentración sub-CIM de 75 µg/mL, por un periodo de 18 h a 35°C. Luego de 18 h de incubación las muestras se centrifugaron 3 veces consecutivas por 5 min a 3000 rpm y se lavaron con buffer PBS. Los pellets obtenidos se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2 % y formaldehído al 4 %, en la proporción 1:1. Posterior a la fijación se trataron nuevamente con tetróxido de osmio al 1% en buffer cacodilato 0,1 M por un periodo de 2 h. Luego se deshidrataron y embebieron en un taco de resina (Araldite) para ser cortadas con ultramicrotomo JEOL JUM-7 y montadas sobre una rejilla de níquel. Las muestras se examinaron con un microscopio Nikon Zeiss LEO 906E (Mengying y col., 2014). Paralelamente, se realizaron los respectivos controles negativos (muestras no tratadas).

8.15 Predictores de parámetros fisicoquímicos relevantes y evaluación de potencial toxicidad: MOLINSPIRATION® y OSIRIS®

Las plataformas electrónicas OSIRIS Property Explorer® (<http://www.chemexper.com/tools/propertyExplorer/main.html>) y MOLINSPIRATION® (<http://molinspiration.com/cgi-bin/properties>), son de acceso libre. Estas son utilizadas como predictores, ya que proveen información acerca de las propiedades de una molécula.

MOLINSPIRATION® es una plataforma en la cual se dibuja la estructura de la molécula o se determina por nomenclatura química. El programa permite obtener datos sobre diferentes propiedades fisicoquímicas como: CLogP, Área Superficial Polar (ASP), Número de grupos aceptores de puente de H (ONs), Número de grupos donores de puente de H (OHNHs), Número de Átomos (NAt), Número de Enlaces Rotables

(NER) y Volumen, entre otras. Parámetros relevantes para el diseño de fármacos y para su posterior correlación con una biodisponibilidad oral favorable en fases clínicas.

Por su parte, OSIRIS® (Sander y col., 2009) también es una plataforma informática interactiva que calcula propiedades fisicoquímicas y toxicológicas relevantes partiendo de una estructura dibujada por el usuario. Esta base de datos evalúa los parámetros y los clasifica con un código de color. El proceso de predicción recae sobre un listado que contiene un conjunto de fragmentos estructurales pre-computarizados, que alertan sobre riesgos en caso de ser encontrados en la molécula dibujada. Estas listas fueron creadas fragmentando rigurosamente todas las sustancias de la base de datos RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances), conocida por poseer compuestos tóxicos de diferentes clases (por ej. mutagénicos). Aquellas propiedades que representan un alto riesgo o efectos indeseados, tales como mutagenicidad, son mostradas en rojo, mientras que el verde indica un comportamiento conforme a una molécula de tipo Fármaco. Las clases de toxicidad que predice el programa son: Mutagenicidad, Tumorigenicidad, Efectos sobre la reproducción e Irritación. Se utilizó sulfixozazol como control para la evaluación del riesgo por OSIRIS® debido a que se conoce su toxicidad y por su similitud estructural con los derivados.

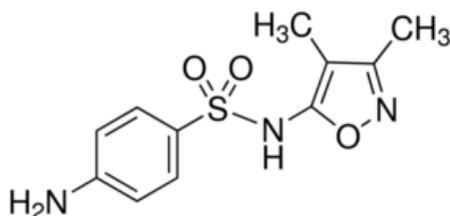


Figura 4. Estructura sulfixozazol

8.16 Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva (media, varianza y desviación estándar) de los valores obtenidos en cada ensayo. Los gráficos representan los resultados expresados como media \pm desviación estándar. Los datos fueron analizados por comparación de medias usando el test de Student con un nivel de significancia del 95%, a través del programa OriginPro 8.5® y del programa Matlab®. Las diferencias * $p < 0,05$ y ** $p < 0,05$ fueron consideradas significativas. Los gráficos fueron confeccionados con el programa OriginPro 8.5®. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado y se repitieron 3 veces, mientras que los experimentos de monitoreo en tiempo real se realizaron 4 veces en ensayos independientes.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Ahmad A, Khan A, Manzoor N, Khan LA. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microb Pathog*. 2010; 48:35-41.
- Aiassa V, Barnes AI, Albesa I. Macromolecular oxidation in planktonic population and biofilms of *Proteus mirabilis* exposed to ciprofloxacin. *Cell Biochem Biophys*. 2014; 68:49-54.
- Aiassa V, Barnes AI, Albesa I. Resistance to ciprofloxacin by enhancement of antioxidant defenses in biofilm and planktonic *Proteus mirabilis*. *Biochem BiophysRes Commun*. 2010; 393:84-8.
- Aiassa V, Barnes AI, Smania AM, Albesa I. Sublethal ciprofloxacin treatment leads to resistance via antioxidant systems in *Proteus mirabilis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2012; 327:25-32.
- Aiassa V, Baronetti JL, Paez PL, Barnes AI, Albrecht C, Pellarin G, Eraso AJ, Albesa I. Increased advanced oxidation of protein products and enhanced total antioxidant capacity in plasma by action of toxins of *Escherichia coli* STEC. *Toxicol In Vitro*. 2011; 25:426-31.
- Aiassa V, Zoppi A, Becerra MC, Albesa I, Longhi MR. Enhanced inhibition of bacterial biofilm formation and reduced leukocyte toxicity by chloramphenicol: β -cyclodextrin:N-acetylcysteine complex. *Carbohydr Polym*. 2016; 152:672-8.
- Ajiboye TO, Habibu RS, Saidu K, Haliru FZ, Ajiboye HO, Aliyu NO, Ibitoye OB, Uwazie JN, Muritala HF, Bello SA, Yusuf II, Mohammed AO. Involvement of oxidative stress in protocatechuic acid-mediated bacterial lethality. *Microbiologyopen*. 2017, doi: 10.1002/mbo3.472.
- Albesa I, Becerra M, Battan P, Paez PL. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317: 605–9.
- Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*. 2011; 473:216–220.
- Angel Villegas N, Baronetti J, Albesa I, Etcheverría A, Becerra MC, Padola NL, Paraje MG. Effect of antibiotics on cellular stress generated in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 biofilms. *Toxicol In Vitro*. 2015; 29:1692-700.
- Aruoma OI, Halliwell B, Dizdaroglu M. Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J Biol Chem*. 1989; 264: 13024–13028.

B

- Bacellar IO, Pavani C, Sales EM, Itri R, Wainwright M, Baptista MS. Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. *Photochem Photobiol*. 2014; 90:801-13.
- Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004; 305:1622-5.
- Balasubramanian B, Pogozelski WK, Tullius TD. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 9738–9743.
- Baldassarri L, Simpson WA, Donelli G, Christensen GD. Variable fixation of staphylococcal slime by different histochemical fixatives. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993; 12:866-8.
- Baldoni D, Haschke M, Rajacic Z, Zimmerli W, Trampuz A. Linezolid alone or combined with rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in experimental foreign-body infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53:1142-8.
- Baptista MS, Cadet J, Di Mascio P, Ghogare AA, Greer A, Hamblin MR, Lorente C, Nunez SC, Ribeiro MS, Thomas AH, Vignoni M, Yoshimura TM. Type and Type II Photosensitized

- Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochem Photobiol.* 2017; 93:912-919.Review.
- Barclay RC, Locke SJ, MacNeil JM, VanKessel J, Burton GW, Inglod KU. Autoxidation of micelles and model membranes. Quantitative kinetic measurements can be made by using either water-soluble or lipid-soluble initiators with water-soluble or lipid-soluble chain-breaking antioxidants. *J Am Chem Soc.* 1984; 106: 2479-2481.
 - Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3:205-14. Review.
 - Bassetti, M.; and E. Righi. Development of novel antibacterial drugs to combat multiple resistant organisms. *Langenbeck's Archives of Surgery.* 2012; 400:153-65.
 - Becerra M, Albesa I. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297:1003–7.
 - Becerra MC, Eraso AJ, Albesa I. Comparison of oxidative stress induced by ciprofloxacin and pyoverdin in bacteria and in leukocytes to evaluate toxicity. *Luminescence.* 2003; 18:334-40.
 - Becerra MC, Páez PL, Laróvere LE, Albesa I. Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* because of oxidative stress generated by Ciprofloxacin. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2006; 285 :29-34.
 - Becerra MC, Sarmiento M, Páez PL, Argüello G, Albesa I. Light effect and reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus*. *J Photochem Photobiol B.* 2004; 76:13-8.
 - Beck MA, Handy J, Levander OA. The role of oxidative stress in viral infections. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 917:906–12.
 - Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Blevins JS, Smeltzer MS. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol.* 2004; 186:4665-84.
 - Belenky P, Ye JD, Porter CB, Cohen NR, Lobritz MA, Ferrante T, Jain S, Korr BJ, Schwarz EG, Walker GC, Collins JJ. Bactericidal Antibiotics Induce Toxic Metabolic Perturbations that Lead to Cellular Damage. *Cell Rep.* 2015; 13:968-80.
 - Benzie IF, Strain JJ. Medición directa de la actividad antioxidante total de fluidos biológicos y versión modificada para mediciones simultáneas del poder antioxidante total y concentración de ácido ascórbico. En: Lester Packer Editors. *Methods in Enzimology.* Vol 299. Oxidants and Antioxidants. Part A. Editorial Academic Press. California 1999; 15-27.
 - Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidante power. The FRAP assay. *Anal Bio.* 1996; 239: 70-76.
 - Bettenbrock K, Bai H, Ederer M, Green J, Hellingwerf KJ, Holcombe M, Kunz S, Rolfe MD, Sanguinetti G, Sawodny O, Sharma P, Steinsiek S, Poole RK. Towards a systems level understanding of the oxygen response of *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol.* 2014; 64:65-114.Review.
 - Biagini G, Sala D, Zini I. Diethyldithiocarbamate, a superoxide dismutase inhibitor, counteracts the maturation of ischemic-like lesions caused by endothelin-1 intrastriatal injection. *Neurosci Lett.* 1995; 190: 212–216.
 - Bogdanov P, Gonzalez M, Sperandeo NR, Fidelio G, Albesa I. An "in vitro"system simulates in membranes the antibacterial mechanism postulated for the action of isoxazolylnaphtoquinoneimine in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 239:186-90.
 - Bradford, M. *Anal. Biochem.*1976; 72:248.

- Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14:320-30. Review.
- Brooijmans, N. y Kuntz, I. D., Molecular recognition and docking algorithms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2003; 32:335-373.
- Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13:620-30. Review.

C

- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol*. 2000; 3:3-8. Review.
- Capeillère-Blandin C, Gausson V, Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1689:91-102.
- Carson L, Gorman SP, Gilmore BF. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 59:447-55.
- Chai D, Liu X, Wang R, Bai Y, Cai Y. Efficacy of Linezolid and Fosfomicin in Catheter-Related Biofilm Infection Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:6413982.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS): Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. Seventh Edition. CSLI document M7-A7. Wayne, Pennsylvania, USA, 2012.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard—10th Edition. CSLI document M07–A10, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, U.S.A., 2015.
- Codreanu SG, Zhang B, Sobocki SM, Billheimer DD, Liebler DC. Global analysis of protein damage by the lipid electrophile 4-hydroxy-2-nonenal. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8:670-80.
- Congreve M, Chessari G, Tisi D, Woodhead AJ. Recent developments in fragment-based drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008; 51: 3361-80.
- Cosgrove JP, Church DF, Pryor WA. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*. 1987; 22:299-304.
- Costerton JW. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol*. 1995; 15:137-40. Review.
- Cox JA, Worthington T. The 'Antibiotic Apocalypse' - Scaremongering or Scientific Reporting? *Trends Microbiol*. 2017; 25:167-169.
- Culakova H, Dzugasova V, Gbelska Y, Subik J. Antibacterial activity of CTBT (7-chlorotetrazolo [5,1 c]benzo[1,2,4]triazine) generating reactive oxygen species. *Microbiol Res*. 2013; 168:147-52.

D

- Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64:847-67. Review.
- Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2:114-22. Review.
- Davis BD. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol Rev*. 1987; 51:341-50.
- Desai NC, Kotadiya GM, Trivedi AR. Studies on molecular properties prediction, antitubercular and antimicrobial activities of novel quinoline based pyrimidine motifs. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014; 24:3126-30.

- Demple B and Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology, *Ann Rev Biochem.* 1994. 63:915-948.
- Di Mascio P, Bechara EJH, Medeiros MHG, Briviba K and Sies H. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxyxynitrite with hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 1994. 355: 287-289-Khan AU and Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1994; 91:12365-12367.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15:167-93. Review.
- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:881-90. Review.
- Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997; 61:377-92. Review.
- Dunnick JK, O'Leary WM. Correlation of bacteria lipid composition with antibiotic resistance. *J Bacteriol.* 1970; 101:892-900.
- Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, MacDonald IC, Martell JD, Takahashi N, Chan CT, Lobritz MA, Braff D, Schwarz EG, Ye JD, Pati M, Vercruyse M, Ralifo PS, Allison KR, Khalil AS, Ting AY, Walker GC, Collins JJ. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111: E2100-9.
- Dwyer DJ, Camacho DM, Kohanski MA, Callura JM, Collins JJ. Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. *Mol Cell.* 2012; 46:561-72.
- Dwyer DJ, Collins JJ, Walker GC. Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015; 55:313-32. Review.
- Dwyer DJ, Kohanski MA, Hayete B, Collins JJ. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol.* 2007; 3:91.

E

- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11:81-128. Review.

F

- Fang FC. Antibiotic and ROS linkage questioned. *Nat Biotechnol.* 2013; 31:415-6.
- Farr SB, Kogoma T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev.* 1991; 55:561-85. Review.
- Fernández-Barat L, Ferrer M, Sierra JM, Soy D, Guerrero L, Vila J, Li Bassi G, Cortadellas N, Martínez-Olondris P, Rigol M, Esperatti M, Luque N, Saucedo LM, Agustí C, Torres A. Linezolid limits burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilm of tracheal tubes. *Crit Care Med.* 2012; 40:2385-9.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000; 408:239-47. Review.
- Foti JJ, Devadoss B, Winkler JA, Collins JJ, Walker GC. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science.* 2012; 336: 315–319.
- Freedman JE. Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: s11–6.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA Repair and Mutagenesis. American Society for Microbiology Press, Washington (DC). 1995

G

- Gabrielson J, Hart M, Jarelöv A, Kühn I, McKenzie D, Möllby R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J Microbiol Methods*. 2002; 50:63-73.
- Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 2012:428010.
- Gefen O, Balaban NQ. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol Rev*. 2009; 33:704-17.
- Gerits E, Blommaert E, Lippell A, O'Neill AJ, Weytjens B, De Maeyer D, Fierro AC, Marchal K, Marchand A, Chaltin P, Spincemaille P, De Brucker K, Thevissen K, Cammue BP, Swings T, Liebens V, Fauvart M, Verstraeten N, Michiels J. Elucidation of the Mode of Action of a New Antibacterial Compound Active against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2016;11: e0155139.
- GERSCHMAN R, GILBERT DL, NYE SW, DWYER P, FENN WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 1954; 119:623-6.
- Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*. 1997; 11:160-7. Review.
- Gomes A, Fernandes E, Lima JL. Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review. *J Fluoresc*. 2006; 16:119-39. Review.
- Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50:949–954.
- Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*. 2002; 43:1367-78. Review.
- Grant SS, Kaufmann BB, Chand NS, Haseley N, Hung DT. Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:12147-52.
- Green SJ, Mellouk S, Hoffman SL, Meltzer MS, Nacy CA. Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: Cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunol Lett* 1990; 25:15–9.
- Gupta, M.K.; and Y.S. Prabhakar. QSAR study on tetrahydroquinoline analogues as plasmodium protein farnesyltransferase inhibitors: a comparison of rationales of malarial and mammalian enzyme inhibitory activities for selectivity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2008; 43:2751-67.
- Gutteridge JM, Quinlan GJ, Kovacic P. Phagomimetic action of antimicrobial agents. *Free Radic Res*. 1998; 28:1-14. Review.
- Gutteridge MC. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection, *Chem. Biol. Interact*. 1994; 91:133-140.

H

- Halliwell B, Gutteridge JMC. The definition and measurements of antioxidants in biological systems. *Free Radicals BioL Med*. 1995. 18:125-126.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 2006; 97:1634-58. Review.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2:95-108. Review.
- Hergert LY, Nieto MJ, Becerra MC, Albesa I, Mazzieri MR. Synthesis of N-benzenesulfonylbenzotriazole derivatives, and evaluation of their antimicrobial activity. *Letters in Drug Design and Discovery*. 2008; 5: 313–318.
- Hou YC, Janczuk A, Wang PG. Current trends in the development of nitric oxide donors, *Curr. Pharm.Des*. 1999; 5: 417–41.

I

- Imlay JA, Fridovich I. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1991; 266:6957-65.
- Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem*. 2008; 77:755-76.
- Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem*. 2008; 77:755-76. Review.
- Imlay JA. Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol*. 2006; 59:1073-82. Review.
- Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*. 2003; 57:395-418. Review.
- Imlay JA. Redox pioneer: professor Irwin Fridovich. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14: 335-40.

J

- Jesudason CD, Beavers LS, Cramer JW, Dill J, Finley DR, Lindsley CW, Stevens FC, Gadski RA, Oldham SW, Pickard RT, Siedem CS, Sindelar DK, Singh A, Watson BM, Hipskind PA. Synthesis and SAR of novel histamine H3 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006 ;16(13):3415-8.
- JME Molecular Editor Applet Allowing Creation or Editing of Molecules. Disponible en línea: <http://www.molinspiration.com/jme> .
- Jørgensen NP, Skovdal SM, Meyer RL, Dagnæs-Hansen F, Fursted K, Petersen E. Rifampicin-containing combinations are superior to combinations of vancomycin, linezolid and daptomycin against *Staphylococcus aureus* biofilm infection in vivo and in vitro. *Pathog Dis*. 2016;74: ftw019.

K

- Kagan VE, Fabisiak JP, Shvedova AA, Tyurina YY, Tyurin VA, Schor NF, Kawai K. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett*. 2000; 477:1-7. Review.
- Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 230:13-8.
- Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2004; 186:8172-80.
- Kester JC, Fortune SM. Persisters and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014; 49:91-101.
- Keyer K, Imlay JA. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 13635-40.
- Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Nilsson D, Jensen PR. The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol*. 2002; 184: 3909–3916.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 2007; 130:797-810.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Wierzbowski J, Cottarel G, Collins JJ. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*. 2008; 135:679–690.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002; 30: 620-650.
- Kostenko V, Lyczak J, Turner K, Martinuzzi RJ. Impact of silver-containing wound dressings on bacterial biofilm viability and susceptibility to antibiotics during prolonged treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54:5120-31.

- Kotova Vlu, Mironov AS, Zavigel'skiĭ GB. [Role of reactive oxygen species in the bactericidal action of quinolones--inhibitors of DNA gyrase]. *Mol Biol (Mosk)*. 2014; 48 :990-8.
- Krumova K, Friedland S, Cosa G. How lipid unsaturation, peroxy radical partitioning, and chromanol lipophilic tail affect the antioxidant activity of α -tocopherol: direct visualization via high-throughput fluorescence studies conducted with fluorogenic α -tocopherol analogues. *J Am Chem Soc*. 2012; 134:10102-13.

L

- Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol*. 1991; 173:6558-67.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13:1057-98.
- Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R. Combined effect of linezolid and N acetylcysteine against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013; 31:655-9.
- Lewin CS, Morrissey I, Smith JT. The mode of action of quinolones: the paradox in activity of low and high concentrations and activity in the anaerobic environment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1991; 10:240-48 25.
- Lewis K. Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000 Sep;64, 503-14. Review.
- Li GW, Burkhardt D, Gross C, Weissman JS. Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell*. 2014; 157: 624-635.
- Lichtenberg D, Pinchuk I. Oxidative stress, the term and the concept. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 461:441-4. Review.
- Lin X, Kang L, Li H, Peng X. Fluctuation of multiple metabolic pathways is required for *Escherichia coli* in response to chlortetracycline stress. *Mol Biosyst*. 2014; 10:901-908.
- Liochev SI, Fridovich I. Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life*. 1999; 48:157-61. Review.
- Liou, J.P.; Z.Y. Wu, C.C. Kuo, C.Y. Chang, P.Y. Lu, C.M. Chen, H.P. Hsieh, and J.Y. Chang. Discovery of 4-amino and 4-hydroxy-1-aryloindoles as potent tubulin polymerization inhibitors *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008; 51:4351-4355.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; 46: 326.
- Livermore DM. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51 Suppl 2: ii9-16. Review.
- Lobritz MA, Belenky P, Porter CB, Gutierrez A, Yang JH, Schwarz EG, Dwyer DJ, Khalil AS, Collins JJ. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112:8173-80.
- Luna CM, Bruno DA, García-Morato J, Mann KC, Risso Patrón J, Sagardía J, Absi R, García Bottino M, Marchetti D, Famiglietti A, Baleztena M, Biancolini C. Effect of linezolid compared with glycopeptides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* severe pneumonia in piglets. *Chest*. 2009; 135:1564-1571.

M

- M. Billany. Soluciones, en "Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas", 2aed., Elsevier, Madrid, 2004, p. 311.

- Ma L, Gao Y, Maresso AW. *Escherichia coli* Free Radical-Based Killing Mechanism Driven by a Unique Combination of Iron Restriction and Certain Antibiotics. *J Bacteriol.* 2015; 197:3708-19.
 - Makrigiorgos GM, Kassis AI, Mahmood A, Bump EA, Savvides P. Novel fluorescein-based flow-cytometric method for detection of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22:93-100.
 - Malik M, Hussain S, Drlica K. Effect of anaerobic growth on quinolone lethality with *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51:28–34 24.
 - Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L, Tsang LH, Smeltzer MS, Horswill AR, Bayles KW. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One.* 2009; 4: e5822
 - Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology.* 2002; 181-182:219–222.
 - Martínez SR, Rocca D, Aiassa V, Becerra MC. Linezolid as an eradication agent against assembled methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *RSC advances.* 2016; 6:101023-28.
 - Masip L, Veeravalli K, Georgiou G. The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxid. Redox Signal.* 2006; 8:753–762.
 - McBride TJ, Preston BD, Loeb LA. Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry.* 1991; 30: 207–213.
 - McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem.* 1969; 244:6056-63.
 - McCord JM, Keele BB Jr, Fridovich I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971; 68:1024-7.
 - Mendes RE, Flamm RK, Hogan PA, Ross JE, Jones RN. Summary of linezolid activity and resistance mechanisms detected during the 2012 LEADER surveillance program for the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58:1243-7.
 - Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des.* 2011; 7:146-57.
 - Mengying He, Ting W, Siyi P, Xiaoyun X. Antimicrobial mechanism of flavonoids against *Escherichia coli* ATCC 25922 by model membrane study. *Appl. Surface Sci.*, 2014; 30: 515-521.
 - Mi H, Wang D, Xue Y, Zhang Z, Niu J, Hong Y, Drlica K, Zhao X. Dimethyl Sulfoxide Protects *Escherichia coli* from Rapid Antimicrobial-Mediated Killing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60:5054-8.
 - Miana G. Búsqueda de compuestos anti-Trypanosoma cruzi a partir de una quimioteca de bencenosulfonilos de heterociclos. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba; Tesis Doctoral disponible en la FCQ-UNC; 2015.
 - Misra HP and Fridovich I. Superoxide dismutase: a photochemical augmentation assay. *Arch Biochem Biophys.* 1977. 181:308-312.
 - Morrissey I, Smith JT. 1994. The importance of oxygen in the killing of bacteria by ofloxacin and ciprofloxacin. *Microbios.* 79:43–53.
- N**
- Naghili H, Tajik H, Mardani K, Razavi Rouhani SM, Ehsani A, Zare P. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Vet Res Forum.* 2013;4 :179-83.
 - Nathan C, Ding A. SnapShot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI). *Cell.* 2010; 140:951-951.

- Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, McKay G, Siehnel R, Schafhauser J, Wang Y, Britigan BE, Singh PK. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*. 2011; 334:982-6.
- Nunoshiba T, Obata F, Boss AC, Oikawa S, Mori T, Kawanishi S, Yamamoto K. Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1991; 274: 34832–34837.

O

- O'Reilly P., Hickman-Davis JM, McArdle P, Randall Young K, Matalon S, "Oxygen Nitrogen Radicals: cell injury and disease: cell injury and disease," Vol. 2., ed. by Val Vallyathan, Vince Castranova, Xianglin Shi, Kluwer Academic Publishers, U.S.A., 2002, pp. 39–45.
- Ober WB, Aloush N. The plague at Granada, 1348-1349: Ibn Al-Khatib and ideas of contagion. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 1982; 58: 418-24.
- Organizacion Mundial de la Salud (OMS), 2015. "Media centre: Fact Sheets":<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/antibiotic-resistance-lacking/es/>
- Otto CC, Cunningham TM, Hansen MR, Haydel SE. Effects of antibacterial mineral leachates on the cellular ultrastructure, morphology, and membrane integrity of *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010; 9:26.

P

- Páez PL, Becerra MC, Albasa I. Antioxidative mechanisms protect resistant strains of *Staphylococcus aureus* against ciprofloxacin oxidative damage. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010; 24:771-6.
- Páez PL, Becerra MC, Albasa I. Chloramphenicol-Induced Oxidative Stress in Human Neutrophils. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2008; 104, 349-353.
- Páez PL, Becerra MC, Albasa I. Comparison of macromolecular oxidation by reactive oxygen species in three bacterial genera exposed to different antibiotics. *Cell Biochem Biophys*. 2011; 61:467-72.
- Páez PL, Becerra MC, Albasa I. Impact of ciprofloxacin and chloramphenicol on the lipid bilayer of *Staphylococcus aureus*: changes in membrane potential. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:276524.
- Pagliero RJ, Lusvarghi S, Pierini AB, Brun R, Mazzieri MR. Synthesis, stereoelectronic characterization and antiparasitic activity of new 1-benzenesulfonyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Bioorg Med Chem*. 2010; 18:142-50.
- Pagliero RJ, Mercado R, MacCraken V, Mazzieri MR, Nieto MJ. Rapid and Facile Synthesis of N-Benzenesulfonyl Derivatives of Heterocycles and their Antimicrobial Properties. *Letters Drug Design Disc*. 2011; 8: 778-791.
- Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2004; 38 :864–870.
- Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res*. 2005; 437:41-7. Review.
- Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 201; 97:55-74. Review.
- Pitts B, Hamilton MA, Zelter N, Stewart PS. A microtiterplate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiol Methods*. 2003; 54:269–276.

R

- Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxyxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med*. 2001; 30:463-88.

- Raetz CR, Dowhan W. Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1990; 265:1235-8. Review.
- Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71:635-700. Review.
- Rego EH, Audette RE, Rubin EJ. Deletion of a mycobacterial divisome factor collapses single-cell phenotypic heterogeneity. *Nature*. 2017; 546:153-157.
- Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, et al. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:8113–8118.
- Rittershaus ES, Baek SH, Sassetti CM. The normalcy of dormancy: Common themes in microbial quiescence. *Cell Host Microbe*. 2013; 13:643–651.
- Roach, S.L.; R.I. Higuchi, M.E. Adams, Y. Liu, D.S. Karanewsky, K.B. Marschke, D.E. Mais, J.N. Miner, and L. Zhi. Discovery of nonsteroidal glucocorticoid receptor ligands based on 6-indole-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Bioorganics & Medicinal Chemistry Letters*. 2008; 18:3504-3508.
- Rodloff A, Bauer T, Ewig S, Kujath P, Müller E. Susceptible, intermediate, and resistant-The intensity of antibiotic action. *Dtsch Arztebl Int*. 2008; 105: 657-662. Review.
- Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods*. 1991; 142:257-65.
- Rogers, G.B; M.P. Carroll, and K.D. Bruce. Enhancing the utility of existing antibiotics by targeting bacterial behavior? *British Journal of Pharmacology*. 2012; 165:845-57.
- Rosato RR, Fernandez R, Paz LI, Singh CR, Rosato AE. TCA Cycle-Mediated Generation of ROS Is a Key Mediator for HeR-MRSA Survival under β -Lactam Antibiotic Exposure. *PLoS ONE*. 2014; 9: e99605.
- Rose WE, Rybak MJ. Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy*. 2006; 26:1099-110.
- Rowan AD, Cabral DJ, Belenky P. Bactericidal antibiotics induce programmed metabolic toxicity. *Microb Cell*. 2016; 3:178-180.

S

- Sander T, Freyss J, von Korff M, Reich JR, Rufener C. OSIRIS, an entirely in-house developed drug discovery informatics system. *J Chem Inf Model*. 2009; 49(2): 232-46. Disponible en línea: <http://www.organicchemistry.org/prog/peo/>.
- Schilcher K, Andreoni F, Dengler Haunreiter V, Seidl K, Hasse B, Zinkernagel AS. Modulation of *Staphylococcus aureus* Biofilm Matrix by Subinhibitory Concentrations of Clindamycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60:5957-67.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012; 9:676-82.
- Schurig-Briccio LA, Yano T, Rubin H, Gennis RB. Characterization of the type 2NADH: menaquinone oxidoreductases from *Staphylococcus aureus* and the bactericidal action of phenothiazines. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1837:954-63.
- Scott JA, Rabito CA. Oxygen radicals and plasma membrane potential. *Free Radic Biol Med*. 1988; 5:237-46.
- Segura A, Molina L, Fillet S, Krell T, Bernal P, Muñoz-Rojas J, Ramos JL. Solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Biotechnol*. 2012; 23:415-2.
- Shakya N, Roy KK, Saxena AK. Substituted 1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yloxypropanes as β 3-adrenergic receptor agonists: design, synthesis, biological evaluation and pharmacophore modeling. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17:830-47.

- Shatalin K, Shatalina E, Mironov A, Nudler E. H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*. 2011; 334:986-90.
- Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ. Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. *Plant Physiol*. 1997; 115:527-532.
- Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015; 4:180-3. Review.
- Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2: a000414.
- Silva F, Lourenço O, Queiroz JA, Domingues FC. Bacteriostatic versus bactericidal activity of ciprofloxacin in *Escherichia coli* assessed by flow cytometry using a novel far-red dye. *J Antibiot (Tokyo)*. 2011; 64:321-5.
- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 2000; 5: 415–418.
- Smirnova G, Muzyka N, Oktyabrsky O. Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells. *Microbiol Res*. 2012; 167:166–172.
- Sohlenkamp C, Geiger O. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol Rev*. 2016; 40:133-59. Review
- Sottriffer, C., Klebe, G., Stahl, M. y Böhm, H-J., Docking and scoring functions/virtual screening. *Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, Abraham, D. J., Ed., John Wiley and Sons, Hoboken, Nueva Jersey, 2003, vol. 1, p. 281-331.
- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res*. 2006; 40:1250-8. Review.
- Stahl W, Sies H. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*. 1997. 46: S14-S17.
- Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001; 358: 135-8. Review.
- Storz G. New perspectives: Insights into oxidative stress from bacterial studies. *Arch Biochem Biophys*. 2016; 595:25-7.
- Stouthamer AH. A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1973; 39:545–565.
- Sun M, Salomon RG. Oxidative fragmentation of hydroxy octadecadienoates generates biologically active gamma-hydroxyalkenals. *J Am Chem Soc*. 2004; 126:5699-708.
- Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC, Shinabarger DL. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42:3251-5.

T

- Thomas VC, Kinkead LC, Janssen A, Schaeffer CR, Woods KM, Lindgren JK, Peaster JM, Chaudhari SS, Sadykov M, Jones J, AbdelGhani SM, Zimmerman MC, Bayles KW, Somerville GA, Fey PD. A dysfunctional tricarboxylic acid cycle enhances fitness of *Staphylococcus epidermidis* during β -lactam stress. *MBio*. 2013; 4(4).
- Tomasz A. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 1979; 33:113-37. Review.
- Torres S, Pandey A, Castro GR. Organic solvent adaptation of Gram positive bacteria: applications and biotechnological potentials. *Biotechnol Adv*. 2011; 29:442-52.
- Touati D. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 373:1-6. Review.

U

- Ueno S, Kusaka K, Tamada Y, Zhang H, Minaba M, Kato Y. An enhancer peptide for membrane-disrupting antimicrobial peptides. *BMC Microbiol*. 2010; 10:46.

V

- Van Faassen EEH, Vanin A, Nitric oxide, in Worsfold P, Townshend A, Poole C (Ed) Encyclopedia of Analytical Science, 2nd ed., Elsevier, 2005; vol. 6 183-191.
- Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J Med Chem.* 2002; 45: 2615-23.
- Vitorino GP, Becerra MC, Barrera GD, Caira MR, Mazzieri MR. Cooperative Behavior of Fluoroquinolone Combinations against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull.* 2017; 40:758-764.

W

- Walsh C. Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol.* 2003. 1:65-70.
- Wang T, Guo D, Dong X, Mu L. Effect of linezolid on hematological and oxidative parameters in rats. *J Antibiot (Tokyo).* 2014; 67:433-7.
- Wang TL, Guo DH, Bai Y, Wen K, Han WY, Wang R. Thrombocytopenia in Patients Receiving Prolonged Linezolid May be Caused by Oxidative Stress. *Clin Drug Investig.* 2016; 36:67-75.
- Wang X, Zhao X, Malik M, Drlica K. Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65:520-4.
- Wang X, Zhao X. Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 1395–1402.
- Wenzel M, Patra M, Senges CH, Ott I, Stepanek JJ, Pinto A, Prochnow P, Vuong C, Langklotz S, Metzler-Nolte N, Bandow JE. Analysis of the mechanism of action of potent antibacterial hetero-tri-organometallic compounds: a structurally new class of antibiotics. *ACS Chem Biol.* 2013; 8:1442-50.
- Wermuth CG. *The Practice of the Medicinal Chemistry.* 3era ed. Wermuth CG, editor. 2008. New York: Academic Press.
- Wickens HJ, Pinney RJ, Mason DJ, Gant VA. Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency, and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:682-7.
- Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2014; 12:35–48.
- Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* 2008; 4:278-86.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capèillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996. 49:1304-1313.
- Woodmansee AN and Imlay JA. Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *J Biol Chem.* 2002. 277:34055-34066.
- World Health Organization Online, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>, accessed June 2016.
- Wrona M, Patel K, Wardman P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38:262.
- Wu S, Yang T, Luo Y, Li X, Zhang X, Tang J, Ma X, Wang Z. Efficacy of the novel oxazolidinone compound FYL-67 for preventing biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69:3011-9.
- Wu X, Wang X, Drlica K, Zhao X. A toxin-antitoxin module in *Bacillus subtilis* can both mitigate and amplify effects of lethal stress. *PLoS One.* 2011;6: e23909.

X

- Xu Z, Liang Y, Lin S, Chen D, Li B, Li L, Deng Y. Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. *Curr Microbiol*. 2016; 73:474-82.

Y

- Yoon SJ, Park JE, Yang JH, Park JW. OxyR regulon controls lipid peroxidation-mediated oxidative stress in *Escherichia coli*. *J Biochem Mol Biol*. 2002; 35:297-301.
- Yunis AA. Chloramphenicol-induced bone marrow suppression. *Semin Hematol*. 1973; 10:225-34. Review.

Z

- Zeraik ML, Petrônio MS, Coelho D, Regasini LO, Silva DH, da Fonseca LM, Machado SA, Bolzani VS, Ximenes VF. Improvement of pro-oxidant capacity of protocatechuic acid by esterification. *PLoS One*. 2014;9: e110277.
- Zhang B. NMR analysis of a stress response metabolic signaling network. *J Proteome Res*. 2014; 10:3743–3754.
- Zhang YM, Rock CO. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6:222-33. Review.
- Zhao X, Hong Y, Drlica K. Moving forward with reactive oxygen species involvement in antimicrobial lethality. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70:639-42.
- Zurenko GE, Gibson JK, Shinabarger DL, Aristoff PA, Ford CW, Tarpley WG. Oxazolidinones: a new class of antibacterials. *Curr Opin Pharmacol*. 2001; 1:470-6. Review.

APÉNDICES I Y II

REACTIVOS Y EQUIPOS

Equipos utilizados

Microscopio de fluorescencia: NIKON TE-2000U (CIBICI, FCQ).

Lector de microplacas para fluorescencia, luminiscencia y absorbancia: Synergia Biotek (CIBICI-FCQ).

Espectrofotómetro uv visible: 50 Conc (UNITFA-FCQ)

Elisómetro: TECAM sunrise (IMVIB-FCQ)

Lector de placas multifunción: TECAM-BioTek (Departamento de química- USP, Brasil)

Microscopio electrónico de barrido (SEM): Carl Zeiss Sigma, del laboratorio de Microscopía y Análisis por Rayos X (LAMARX de la UNC)

Microscopio electrónico de transmisión (TEM): Nikon Zeiss LEO 906E (FCM, UNC).

Lector de microplacas: Synergy H4, BioTek (Cosa group Chemical Imaging McGill University, Canadá).

Microscopio de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF): Olympus IX-71, EMCCD (Cascade II:512; Roper Scientific, Tucson, AZ), TIRF (IX2-RFAEVA-2, Olympus), (Cosa group Chemical Imaging McGill University, Canadá).

Reactivos

Azul de nitrotetrazolio “NBT”: Sigma-Aldrich

Ciprofloxacina: Sigma-Aldrich

Linezolid: Pfizer

diacetato 2',7'-dicloro-hidrofluoresceína (H₂DCFDA): Sigma-Aldrich

sulfanilamida: Sigma-Aldrich

N-1-naftil etilendiamina (NEED): Sigma-Aldrich

Proti 2: Wiener Lab

Reactivo de Bradford: Sigma-Aldrich

Riboflavina: Sigma-Aldrich

Metionina: Sigma-Aldrich

EDTA: Cicarelli

Cloramina T: Cicarelli

Yoduro de potasio (KI): Cicarelli

5, 6 carboxifluoresceína (CF): Sigma-Aldrich

DOPC (1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina); DOPE (1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina); DODAB (Dioctadecil dimetil bromuro de amonio); PG (1,2-diarachidonoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]): Avanti polar lipids

Sephadex 50: Sigma-Aldrich

Cristal Violeta: Britania

XTT y PMS: Sigma-Aldrich

1,2,3 dihidrorodamina (DHR): Sigma-Aldrich
tripiridiltriazina férrica TPTZ: Cicarelli
Ficoll-Hypaque: Sigma-Aldrich
Tritón X-100: Sigma-Aldrich
Albumina sérica humana: Lab. Hemoderivados, UNC.
Solventes: Biopack en general
Experimentos captura de imágenes:
Solventes Sigma-Aldrich para cultivos celulares
Reactivos Sigma-Aldrich
Buffer y Agua: GE Healthcare Life Sciences

SOLUCIONES BUFFER Y MEDIOS DE CULTIVO

Buffer salino de fosfatos (PBS)

NaCl 8,0 g

KCl 0,2 g

Na₂HPO₄ 1,15 g

KH₂PO₄ 0,2 g

Agua destilada c.s.p. 1000 mL

pH: 7,0 ± 0,2

Tris buffer

Tris 1,2 g

NaCl 17,5 g

Agua miliQ c.s.p 1000 mL

Ajustar pH con NaOH 0,5 M a 8,0 ± 0,2

Agar Müeller Hinton (MH)-Britania

Infusión de carne 300,0 g

Peptona ácida de caseína 17,5 g

Almidón 1,5 g NaCl 5,5 g

Agar 15,0 g

Agua destilada c.s.p. 1000 mL

pH: 7,3 ± 0,1

Preparación: Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Caldo Müeller Hinton (MH)-Britania

Infusión de carne 300,0 g

Peptona ácida de caseína 17,5 g

Almidón 1,5 g

Agua destilada c.s.p. 1000 mL

pH: 7,3 ± 0,2

Preparación: Suspender 22 g del medio en un litro de agua destilada y dejar embeber 10 minutos, agitando periódicamente. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Distribuir en tubos, esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Agar Tripteína Soya (TS)-Britania

Tripteína 15,0 g

Peptona de soya 5,0 g

Glucosa 1,0 g

NaCl 5,5 g

Agar-agar 2,5 g

Agua destilada c.s.p. 1000 mL

pH: 7,3 ± 0,2

Preparación: Disolver 40 g de polvo deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Distribuir y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Caldo Tripteína Soya (CTS)-Britania

Tripteína 17,0 g

Peptona de soya 3,0 g

NaCl 5,0 g

K₂HPO₄ 2,5 g

Glucosa 2,5 g

Agua destilada c.s.p. 1000 mL

pH: 7,3 ± 0,2

Preparación: Suspender 30 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar y calentar hasta disolver. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos

Caldo Luria Bertani (LB)-Lennox

Extracto de levadura 5,0 g

NaCl 5,0 g

pH: 7,2

Preparación: Disolver 20 g en un litro de agua destilada. Mezclar y calentar hasta disolver. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos

Agar Luria Bertani (LB)-Lennox

Triptono 10,0 g

Extracto de levadura 5,0 g

NaCl 5,0 g

Agar 12,0 g

pH: 7,2

Preparación: Disolver 23 g en un litro de agua destilada. Mezclar y calentar hasta disolver. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 1 h.