

Universidad de Panamá
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología
Vicerrectoría de Investigación y Postgrado
Programa de Maestría en Microbiología Ambiental

Inhibición de factores de resistencia a antibióticos de acción ribosomal mediante el uso de aptámeros.

Presentado por:
Ing. Juan R. Medina S.

Asesor:
Jordi Querol-Audí PhD.

Trabajo de Graduación presentado a la Universidad de Panamá
Requisito para optar por el título de Magister en Microbiología Ambiental

República de Panamá

2024

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mis padres, porque su respaldo fue mi motivación para seguir adelante. En especial a mi madre, Sara, que dedicó su vida para apoyarme en todo momento y en cada paso que di.

Agradecimiento

Debo agradecer a mi asesor y amigo Jordi Querol, por compartir sus conocimientos y experiencias conmigo a lo largo de todo este recorrido. A mis amigos y compañeros del laboratorio (MS, EM, GR, EF y KC), por todo el apoyo que me brindaron durante la ejecución de este proyecto. Al laboratorio que me acogió durante este par de años y a los múltiples asesores que extendieron su tiempo y aportaron su granito de arena para que este proyecto fuera ejecutado. Finalmente, a la SENACYT y al Programa de Maestría en Microbiología Ambiental, por los fondos aportados.

Índice general

Dedicatoria	3
Agradecimiento	3
Índice general	4
Índice de tablas	7
Índice de figuras	8
Resumen	10
Abstract.....	10
Introducción.....	11
Justificación.....	12
Alcances	13
Limitaciones	13
Objetivos.....	13
Capítulo 1. Marco teórico.....	14
1.1. Introducción a los antibióticos.....	14
1.2. Introducción a la resistencia a los antibióticos	15
1.3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos	15
1.3.1. Modificación de flujo	15
1.3.2. Inactivación enzimática	16
1.3.3. Modificación de los sitios de unión a los antibióticos.....	16
1.4. Resistencias intrínsecas	17
1.5. Resistencia adquirida.....	17
1.6. Resistencias en el ambiente	18
1.7. Multirresistencia bacteriana.....	19
1.8. Ribosoma como blanco de antibióticos.....	19
1.9. Antibióticos de unión a la subunidad ribosomal 30S	20
1.9.1. Aminoglucósidos.....	20
1.9.2. Tetraciclinas.....	22
1.9.3. Otros antibióticos de unión a la subunidad ribosomal 30S	24
1.10. Antibióticos de unión a la subunidad ribosomal 50S	24

1.10.1.	Macrólidos	24
1.10.2.	Anfenicoles	26
1.10.3.	Otros antibióticos de unión a la subunidad ribosomal 50S	28
1.11.	Aptámeros	28
1.11.1.	Clasificación, estructura y aplicación de los aptámeros	28
1.11.2.	SELEX	30
1.11.3.	Interacciones aptámero-proteína	30
1.11.4.	Aptámeros como inhibidores	31
Capítulo 2.	Metodología	32
2.1.	Colecta de muestras y fuentes de agua	32
2.2.	Detección y aislamiento de <i>E. coli</i>	32
2.3.	Confirmación molecular de <i>E. coli</i>	33
2.4.	Ensayo de susceptibilidad a antibióticos dirigidos a ribosoma	33
2.5.	Extracción de ADN genómico de <i>E. coli</i>	34
2.6.	Detección molecular de genes de resistencia a los antibióticos.	34
2.7.	Diseño de la librería de aptámeros de ARN de secuencia aleatoria	37
2.8.	Preparación de células electrocompetentes.	37
2.9.	Diseño de genes sintéticos	37
2.10.	Clonaje de genes sintéticos para expresión de proteínas recombinantes	38
2.11.	Verificación del clonaje de genes	38
2.12.	Expresión de proteínas recombinantes.	38
2.13.	Purificación de proteínas recombinantes	39
2.14.	Detección de aptámeros de ARN con capacidad de unión a las proteínas diana mediante “Pull down” y amplificación	40
2.15.	Identificación de aptámeros de ARN mediante clonaje y secuenciación	41
2.16.	Pruebas funcionales	42
2.16.1.	Diseño del pARC y pARC2	42
2.17.	Análisis de la interacción proteína-aptámero	45
2.18.	Análisis estadístico	46
Capítulo 3.	Resultados	47
3.1.	Aislamiento de <i>E. coli</i>	47

3.2.	Confirmación molecular de aislados de <i>E. coli</i>	47
3.3.	Ensayo de susceptibilidad a antibióticos dirigidos a ribosoma	50
3.4.	Detección molecular de genes de resistencia	56
3.5.	Clonaje de genes sintéticos para expresión de proteínas recombinantes	61
3.6.	Expresión de proteínas bajo diferentes condiciones.....	62
3.7.	Purificación de proteínas	67
3.8.	Detección de aptámeros con afinidad por las dianas purificadas	70
3.9.	Identificación de aptámeros mediante clonaje y secuenciación	73
3.10.	Pruebas funcionales	76
3.11.	Interacción proteína-ARN	81
Capítulo 4. Discusión.....		83
4.1.	Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i>	83
4.2.	Fenotipos y genotipos de resistencia	83
4.3.	Metiltransferasas del ARNr.....	87
4.4.	Aislamiento de aptámeros con afinidad a los factores de resistencia y pruebas funcionales para determinar su capacidad de unión e inhibición del fenotipo de resistencia.....	89
4.5.	Interacción ARN-proteína	91
Capítulo 5. Conclusión		92
Capítulo 6. Recomendaciones.....		93
Capítulo 7. Referencias.....		94
Anexos		107

Índice de tablas

Tabla 1. Familias de antibióticos y sus mecanismos de acción.	14
Tabla 2. Metiltransferasas del ARNr y su fenotipo de resistencia.	22
Tabla 3. Clasificación de los genes de resistencia a las tetraciclinas de acuerdo con su mecanismo de resistencia.	24
Tabla 4. Metiltransferasas de la familia Erm y su fenotipo de resistencia.	26
Tabla 5. Comparación de aptámeros y anticuerpos monoclonales.	29
Tabla 6. Listado de cebadores utilizados en la PCR Multiplex de confirmación de <i>E. coli</i> . 33	
Tabla 7. Rangos de dilución y valores de referencia para pruebas de microdilución.	34
Tabla 8. Secuencia de cebadores para la detección de genes de resistencia a aminoglucósidos.	35
Tabla 9. Secuencia de cebadores para la detección de genes de resistencia a cloranfenicol.	36
Tabla 10. Secuencia de cebadores para la detección de genes de resistencia a tetraciclina. 37	
Tabla 11. Condiciones ensayadas para la expresión de las proteínas recombinantes NpmA, RmtB, ArmA y ErmC.	39
Tabla 12. Composición de tampones utilizados para la purificación de las proteínas recombinantes NpmA, ArmA y RmtB.	40
Tabla 13. Principales características de los vectores utilizados, incluyendo el vector diseñado pARC/pARC2.	42
Tabla 14. Resumen de aislados que presentaban fenotipos de resistencia conjunta a diferentes aminoglucósidos según los puntos de muestreo.	55
Tabla 15. Resumen de la frecuencia de los genes de resistencia a los antibióticos detectados en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de la PTAR y el río Juan Díaz.	57
Tabla 16. MIC de los diferentes constructos transformados en <i>E. coli</i> DH5a	77

Índice de figuras

Figura 1. Rutas de transmisión de bacterias patógenas e intercambio genético en el ambiente..	18
Figura 2. Clasificación de la familia de los aminoglucósidos.	21
Figura 3. Familia de tetraciclinas	23
Figura 4. Estructura química del cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol.	26
Figura 5. Localización de puntos de colecta de muestras de agua.	32
Figura 6. Esquema del diseño de genes sintéticos.	38
Figura 7. Esquema del método SELEX adaptado para la detección de aptámeros con afinidad a las proteínas recombinantes ArmA, RmtB y NpmA.	41
Figura 8. Diseño del vector pARC-ArmA.	44
Figura 9. Detección de <i>E. coli</i> a partir de muestras de agua del río Juan Díaz y la PTAR de la Ciudad.	47
Figura 10. Verificación de la temperatura de hibridación de los genes para identificación molecular de <i>E. coli</i>	48
Figura 11. Resultados de PCR Multiplex de confirmación molecular de <i>E. coli</i>	49
Figura 12. Confirmación molecular de cepas presuntivas de <i>E. coli</i>	49
Figura 13. Perfiles de resistencia a los antibióticos de acción ribosomal de los aislados de <i>E. coli</i> .	50
Figura 14. Perfiles de resistencia a los aminoglucósidos	51
Figura 15. Distribución de MICs de los aminoglucósidos	52
Figura 16. Fenotipos de resistencia a los aminoglucósidos.	54
Figura 17. Distribución de MICs de tetraciclina y cloranfenicol.	55
Figura 18. Patrones de multirresistencia de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de la PTAR y del río Juan Díaz	56
Figura 19. Resultados de la detección mediante PCR del gen de resistencia a tetraciclina <i>tet(A)</i>	57
Figura 20. Distribución de genes de resistencia a tetraciclina.	58
Figura 21. Genes de resistencia a cloranfenicol detectados en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de la PTAR de la Ciudad y del río Juan Díaz.	58
Figura 22. Distribución de genes de resistencia a cloranfenicol	59
Figura 23. Genotipos de resistencia detectados entre los aislados resistentes de <i>E. coli</i>	60
Figura 24. Distribución de MICs de la eritromicina para cepas de <i>E. coli</i>	61
Figura 25. Resultado de la verificación del clonaje de pET28a-ArmA y pET28a-RmtB mediante PCR de colonia	61
Figura 26. Verificación de clonaje de pET28a-ErmC mediante PCR de colonia	62
Figura 27. Transformación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> cepa BL21(DE3) con vector pET28a-NpmA	62
Figura 28. Expresión de NpmA a 37°C utilizando diferentes concentraciones de IPTG durante diferentes tiempos de incubación.	63
Figura 29. Expresión de NpmA a 25°C utilizando IPTG o medio de autoinducción.	63
Figura 30. Expresión de NpmA a diferentes temperaturas	64
Figura 31. Expresión de RmtB a diferentes temperaturas y tiempos de inducción.	64

Figura 32. Diferentes temperaturas de expresión de RmtB.....	65
Figura 33. Influencia de la congelación en la solubilidad de ArmA	66
Figura 34. Verificación de expresión a 25°C de diferentes colonias de pET28a-ermC	66
Figura 35. Purificación de la proteína recombinante NpmA.....	68
Figura 36. Cromatograma de purificación por afinidad de ArmA y RmtB	70
Figura 37. Amplificación de aptámeros por RT-PCR utilizando diferentes temperaturas de hibridación.....	71
Figura 38. Amplificación de aptámeros por PCR utilizando diferentes temperaturas de hibridación.....	71
Figura 39. Aptámeros detectados mediante RT-PCR	72
Figura 40. Aptámeros detectados mediante RT-PCR	72
Figura 41. Librería de aptámeros con afinidad por NpmA detectados por RT-PCR.	73
Figura 42. Identificación de aptámeros mediante <i>Blue-white screening</i>	74
Figura 43. Resultados de la PCR de colonia para la verificación de aptámeros con afinidad por ArmA insertados en el vector pBSMrnaStrp.....	74
Figura 44. Resultados de la segunda verificación del clonaje aptámeros con afinidad por ArmA en el vector pBSMrnaStrp	75
Figura 45. PCR de colonia para la verificación de aptámeros con afinidad por RmtB insertados en el pBSMrnaStrp.....	75
Figura 46. Secuencias de aptámeros con afinidad a las proteínas recombinantes ArmA, NpmA y RmtB,.....	76
Figura 47. Ensayo de microdilución en placa para la determinación de la MIC de amikacina de cepas de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con los vectores pGDP3-ArmA y pGDP4-ArmA	76
Figura 48. Verificación de dobles transformantes de pBSM-A* y pGDP4-ArmA mediante PCR de colonia	77
Figura 49. Verificación de dobles transformantes de pBSM-A1 y pGDP4-ArmA mediante digestión de vectores plasmídicos	78
Figura 50. Verificación de las colonias previo a los ensayos de microdilución	78
Figura 51. Comprobación del vector pARC-ArmA mediante digestión con NdeI del ADN plasmídico.....	79
Figura 52. Prueba funcional del cepas de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con el vector pARC-ArmA.....	79
Figura 53. Ensayo de expresión de aptámeros de ARN en cepas de <i>E. coli</i> DH5 α cotransformadas con los vectores pARC-ArmA y pBSM-A1.....	80
Figura 54. Ensayo de microdilución en placa con cepas cotransformadas con los vectores pARC-ArmA y pBSM-A*	80
Figura 55. Gel nativo de poliacrilamida al 10% con las proteínas NpmA, ArmA y RmtB, purificadas mediante cromatografía de afinidad y exclusión molecular.	81
Figura 56. Gel nativo de poliacrilamida al 10% teñido con GelGreen:ArmA.	81
Figura 57. Gel nativo de poliacrilamida al 10% teñido con GelGreen: RmtB.....	82
Figura 58. Gel nativo de poliacrilamida al 10% teñido con GelGreen y azul de Coomassie	82

Resumen

La resistencia a los antibióticos es una de las mayores preocupaciones globales. La gran diseminación de genes de resistencia a los antibióticos y la falta de nuevos medicamentos amenazan el tratamiento de infecciones graves causadas por bacterias patógenas. El ribosoma es uno de los principales blancos de los antibióticos, al menos 8 clases se unen a las unidades ribosomales y previenen la síntesis de proteínas, llevando a la bacteria a la muerte. Para prevenir la acción de antibióticos dirigidos al ribosoma, se han descrito diferentes mecanismos en las bacterias, pero los más importantes son llevados a cabo por metiltransferasas del ARN ribosomal. En este estudio se documenta la prevalencia de fenotipos y genes de resistencia a los antibióticos dirigidos al ribosoma de cepas de *E. coli* aisladas de aguas residuales y naturales de la Ciudad de Panamá y se estudian métodos para inhibir las metiltransferasas del ARN ribosomal utilizando aptámeros obtenidos a través del método SELEX y de pruebas funcionales.

Abstract

Antibiotic resistance is one of the major concerns globally. The wide spread of antibiotic resistance genes and the lack of new antibiotics threatens the treatment of serious infections caused by pathogenic bacteria. Ribosome is one of the main antibiotics targets, at least 8 antibiotic classes bind to ribosomal subunits preventing the protein synthesis, leading the bacteria to death. To prevent the action of ribosomal targeting antibiotics several resistance mechanisms are found in bacteria but the most important is driven by ribosomal RNA methyltransferases. The prevalence of ribosome targeting antibiotic resistance phenotypes and genes from *E. coli* strains isolated from sewage and river samples in Panama City are reported and aptamer-based methods are studied to inhibit the ribosomal RNA methyltransferases through SELEX procedure and functional assays.

Introducción

Los antibióticos son los recursos más utilizados en la medicina, veterinaria y agricultura para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Sin embargo, la resistencia a los antibióticos pone en riesgo la efectividad de los antibióticos, siendo reconocida como una amenaza para la salud.

En este trabajo se abordan los mecanismos de resistencia a los antibióticos dirigidos al ribosoma y se expone el estado de las resistencias a estas familias de antibióticos en aislados de aguas naturales y residuales en la Ciudad de Panamá. Se busca determinar la prevalencia de los fenotipos y genotipos de resistencia de la Enterobacteriácea *Escherichia coli*, asociada con la transmisión y dispersión de genes de resistencia, para lo que se aislaron cepas de esta bacteria a partir muestras de agua del río Juan Díaz y del influente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la Ciudad. Además, se presentan los diferentes fenotipos de resistencia y multirresistencia a 3 familias de antibióticos dirigidos al ribosoma: los aminoglucósidos, tetraciclinas y anfenicoles; así como, los principales genes de resistencia detectados y la descripción de los genotipos encontrados.

Esta investigación también estudia los factores más notables de resistencia a las familias de aminoglucósidos, tetraciclinas, anfenicoles y macrólidos. Encontrándose que las metiltransferasas del ARN ribosomal son los factores de resistencia a los antibióticos más importantes por su capacidad de conferir resistencia a múltiples antibióticos de la misma familia e incluso de familias de antibióticos diferentes.

Así, se definieron las condiciones para la purificación de factores de resistencia a los antibióticos de acción ribosomal y se proponen métodos para la selección, identificación y expresión de aptámeros de ARN con capacidad para inhibir dichos factores de resistencia. Los métodos utilizados incluyen el diseño de la librería de aptámeros de ARN, la selección de aptámeros con afinidad por las dianas y se proponen soluciones innovadoras para la expresión *in vivo* de los aptámeros en células de *E. coli*.

Justificación

La resistencia a antibióticos es reconocida como una de las mayores amenazas globales para la salud. Supone una amenaza a la medicina moderna y a la respuesta de tratamiento de enfermedades infecciosas; además, de incrementar los costos médicos, la estancia hospitalaria y los índices de mortalidad (FAO *et al.*, 2021; Organización Mundial de la Salud, 2016).

La evolución de la resistencia a los antibióticos está asociada a la contaminación ambiental. Numerosos estudios correlacionan la concentración de antibióticos con la abundancia de genes de resistencia en muestras ambientales. Las vías de contaminación por antibióticos al ambiente incluyen excreciones humanas y animales, disposición inadecuada de medicamentos, agricultura, industrias y por efluentes de aguas residuales. Se requieren estrategias para mitigar la resistencia a los antibióticos sobre todo en la producción de alimento vivo, tratamiento de agua y ambiente (Larsson & Flach, 2022; Ma *et al.*, 2019).

Los antibióticos son utilizados en la cría de animales, para mejorar la producción y en cultivos para el control de enfermedades. El número de antibióticos contenidos en la carne producida y en el estiércol (muchas veces utilizado como fertilizante) puede ser alta; en estos, se ha reportado la presencia de bacterias resistentes. Además, frutas y vegetales pueden contaminarse de forma cruzada con bacterias resistentes presentes en aguas de riego y desechos animales. En consecuencia, se mantiene el riesgo de enfermedades debido a la intoxicación por patógenos resistentes (Koch *et al.*, 2021).

En la actualidad, se ha encontrado resistencia a todas las clases de antibióticos aprobadas (naturales, semi sintéticos y sintéticos) (Larsson & Flach, 2022). El incremento de las resistencias a β -lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos es un problema clínico debido a la necesidad del tratamiento de infecciones contra patógenos Gram-negativos como *Enterococcus faecium*, *Shaphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp (Bassetti *et al.*, 2021; Escolà-Vergé *et al.*, 2020; Koulenti *et al.*, 2019). Por ello, la investigación para la identificación de nuevos compuestos que permitan la inhibición de factores asociados a las resistencias a antibióticos es una emergencia mundial.

A pesar de que las secuencias de los componentes ribosomales (proteínas y ARN ribosomal) han ido modificándose con el tiempo, la forma en que los componentes se pliegan y acomodan se ha mantenido a lo largo del curso evolutivo. Esta conservación de la estructura funcional lo ha convertido en el blanco de al menos 8 clases diferentes de antibióticos comúnmente usadas en medicina para combatir infecciones. Sin embargo, algunas bacterias han adquirido mecanismos de metilación del ARN ribosomal que les confieren resistencia a múltiples antibióticos o clases de antibióticos; motivo por el que esta propuesta va dirigida a la inhibición de factores de resistencia dirigidos al ribosoma, utilizando como dianas las metiltransferasas de ARN ribosomal.

Por ello, planteamos la identificación y caracterización de aptámeros, por su potencial de unirse a enzimas con gran afinidad, su flexibilidad y bajo costo de producción. Además, se

ha demostrado que estos ligandos son capaces de inhibir la actividad enzimática de varias proteínas, con lo que es posible aislar aquellos que tengan afinidad a las dianas mencionadas. La aplicación del método SELEX será apropiada para el aislamiento y selección de dichos aptámeros.

Alcances

En esta tesis se investiga el potencial de los aptámeros de ARN como inhibidores de la actividad enzimática de metiltransferasas del ARN ribosomal que confieren resistencia a los antibióticos de la familia de los aminoglucósidos y macrólidos. Se establecen metodologías para la selección y detección de aptámeros con afinidad a dichas proteínas, las pruebas necesarias para comprobar la acción inhibitoria de los aptámeros y métodos para verificar la interacción entre los complejos proteína-aptámero.

Limitaciones

El presente trabajo de graduación se limitó a los resultados obtenidos durante el periodo estipulado dentro del contrato del Programa de Maestría en Microbiología Ambiental. Sin embargo, los resultados aquí obtenidos no representan un alto a la investigación. Se continuará ejecutando esta investigación en el marco del proyecto APY-NI-2022-14, financiado por la SENACYT a través de la Convocatoria Pública de Nuevos Investigadores e Innovadores 2022.

Objetivos

Objetivo general: Caracterizar aptámeros de ARN capaces de inhibir factores de resistencia a antibióticos de acción ribosomal.

Objetivos específicos:

- Determinar la prevalencia de factores de resistencia a antibióticos de acción ribosomal en aislados de *E. coli* ambientales.
- Definir las condiciones de clonaje, sobreexpresión y purificación de factores de resistencia ribosomal.
- Analizar los aptámeros de ARN con capacidad de unión a dianas de interés.
- Identificar aptámeros de ARN de interés mediante clonaje y secuenciación.
- Determinar la afinidad y actividad inhibitoria de al menos un aptámero de ARN mediante ensayos cinéticos y funcionales.

Capítulo 1. Marco teórico

1.1. Introducción a los antibióticos

Los antibióticos son uno de los recursos más utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por patógenos bacterianos. La penicilina, el primer antibiótico natural descubierto en 1928, inició la era de oro de la identificación de nuevos antibióticos; pero, después de su cúspide en 1950, los hallazgos de nuevas biomoléculas con actividad bactericida declinaron (Hutchings *et al.*, 2019). A partir de 1957, los nuevos antibióticos fueron producidos mediante síntesis o modificaciones químicas a partir de los antibióticos ya existentes. Actualmente, entre 20 y 36 antibióticos son utilizados comúnmente en medicina, agricultura y acuicultura (Zhuang *et al.*, 2021).

Los antibióticos se dividen en distintas clases con base en (i) su origen: naturales, es decir, producidos por microorganismos en procesos competitivos y/o de supervivencia y sintéticos (sintetizados en laboratorio y aprobados para el tratamiento de enfermedades); (ii) la respuesta en la célula: bactericidas (matan las bacterias) y bacteriostáticos (impiden la división/reproducción de la bacteria); (iii) mecanismos de acción: (a) β -lactámicos, (b) macrólidos, cloranfenicol y oxazolidinones, (c) aminoglucósidos y tetraciclinas, (d) quinolonas y (e) sulfonamidas (Upmanyu y Malviya, 2020).

Hasta la fecha, más de 400 agentes antimicrobianos se encuentran disponibles en el mercado. Entre estos, los más abundantes incluyen las cefalosporinas (45%), penicilinas (15%), quinolonas (11%), tetraciclinas (6%), macrólidos (5%), aminoglucósidos, sulfamidas, oxazolidinas y azoles (Upmanyu y Malviya, 2020). Las clases más relevantes tienen procedencia natural (producidas por hongos, actinomicetos y otras bacterias) y una gran cantidad procede de los géneros de *Streptomyces* (Hutchings *et al.*, 2019).

Tabla 1. Familias de antibióticos y sus mecanismos de acción.

Mecanismo de acción	Familia de antibióticos
Inhibición de la síntesis de la pared celular	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, daptomicina, monolactámicos, glucopéptidos.
Inhibición de la síntesis de proteínas	Tetraciclinas, aminoglucósidos, oxazolidinonas, estreptograminas, cetólidos, macrólidos, lincosamidas.
Inhibición de la síntesis de ADN	Fluoroquinolonas
Inhibición competitiva de la síntesis de ácido fólico	Sulfonamidas, trimetoprima
Inhibición de la síntesis de ARN	Rifampicina
Otros	Metronidazol

Adaptado de: *Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses* (Levy y Marshall, 2004).

Los antibióticos son muy específicos en su modo de acción contra los microbios. Su función es interferir en mecanismos presentes en la célula bacteriana que se encuentran ausentes en las células eucariotas. Estos pueden involucrar el bloqueo de la replicación del material genético, síntesis de la pared bacteriana o cualquier otro proceso indispensable para la viabilidad celular (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Después de matar o inhibir el crecimiento de las bacterias, el sistema inmunológico se encarga de eliminar todas las partes patógenas y acabar con la infección (Naveed *et al.*, 2019).

1.2. Introducción a la resistencia a los antibióticos

A pesar de la importancia de los antibióticos, la resistencia microbiana dificulta el tratamiento de infecciones y aumenta el riesgo de propagación. Se conoce que los mecanismos de resistencia datan de la era previa al uso de antibióticos; sin embargo, la falta de nuevos antibióticos y el incremento de patógenos multirresistentes se ha convertido en uno de los problemas mundiales de mayor relevancia (Matzov *et al.*, 2017; Uddin *et al.*, 2021). Además, el uso y abuso de estos fármacos en medicina y agricultura ha tenido un impacto significativo en la incidencia, selección y dispersión de las resistencias (Vester y Long, 2009).

1.3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos se pueden resumir en tres: modificación del flujo (incrementando la salida o reduciendo la entrada del antibiótico a la célula), inactivación enzimática y modificación del sitio de unión del antibiótico (Wencewicz, 2019). Estos mecanismos de resistencia suelen ser conferidos por genes de resistencia o multi resistencia asociados a plásmidos. Las dos formas por las que las bacterias pueden adquirir resistencia incluyen la mutación espontánea de genes ya existentes, que produzca genes de resistencia, u obteniéndose mediante transferencia horizontal (Li y Zhang, 2022).

1.3.1. Modificación de flujo

Cada bacteria tiene una habilidad diferente para limitar el ingreso de los antibióticos. En el caso de las gramnegativas, la capa de LPS proporciona una barrera para ciertos tipos de moléculas. Bacterias con membranas con alto contenido lipídico pueden limitar el acceso a moléculas hidrofílicas, pero los antibióticos hidrofóbicos tendrán un acceso facilitado. En otro caso, bacterias que carezcan de pared celular serán intrínsecamente resistentes a antibióticos como β -lactámicos y glucopéptidos, cuyo blanco es este componente celular.

Otra estrategia para limitar la entrada de los antibióticos es la reducción del número de porinas presentes. Algunas enterobacterias son conocidas por convertirse en resistentes al alterar su número de porinas, reduciendo el acceso a moléculas hidrofílicas. Las mutaciones dentro del canal de las porinas también se han observado en bacterias resistentes a carbapenémicos, cefalosporinas y tetraciclinas.

Otro fenómeno que puede proporcionar resistencia es la formación de biopelículas por una comunidad bacteriana. Estas matrices son gruesas, compuestas por polisacáridos, proteínas y ADN de las bacterias residentes, que dificulta a los antimicrobianos el acceso a la bacteria.

En estos casos, la concentración del antibiótico debe ser mucho más alta para ser efectiva. Aunque, estas comunidades favorecen la transferencia horizontal de genes de resistencia debido a la proximidad entre las células bacterianas (Reygaert, 2018).

Un caso particular son las bombas de eflujo. Estas son proteínas de transporte localizadas en la membrana citoplasmática de la bacteria y están involucradas en la regulación del ambiente interno al expulsar sustancias tóxicas, moléculas de *quorum sensing* y reducir iones de metales pesados. Aunque, hasta el momento, se han encontrado 6 familias principales de bombas de eflujo, la redundancia de sustratos existe entre todas estas clases, tal que un antibiótico puede ser exportado por diferentes bombas de eflujo y una única bomba de eflujo puede exportar sustratos estructural y químicamente diferentes (Gaurav et al., 2023).

1.3.2. Inactivación enzimática

Las 2 formas en que las enzimas inactivan los antibióticos son: por degradación o modificación del antibiótico. Las enzimas involucradas suelen ser hidrolasas, transferasas y oxidorreductasas. Las hidrolasas catalizan la hidrólisis de los antibióticos y son las responsables de resistencias a β -lactámicos, fosfomicina y cloranfenicol. En el caso de la transferencia de un grupo químico, la modificación más usual es mediada por transferasas, que transfieren grupos acetil, fosforil o adenil; siendo la acetilación el mecanismo más utilizado contra aminoglucósidos, cloranfenicol, estreptograminas y fluoroquinolonas; mientras que la fosforilación y adenilación son principalmente utilizados contra los aminoglucósidos. Por último, un ejemplo de oxidorreductasa es la mono-oxigenasa dependiente de flavina TetX, que confiere resistencia a todas las tetraciclinas mediante la monohidroxilación de tetraciclinas en presencia de NADPH, O_2 , y Mg^{2+} (Egorov et al., 2018; Reygaert, 2018).

1.3.3. Modificación de los sitios de unión a los antibióticos

Existen múltiples componentes en la célula bacteriana que pueden ser blanco de antibióticos. Asimismo, existen múltiples componentes que pueden ser modificados para evadir el efecto de los antibióticos. Las bacterias pueden inducir cambios morfológicos como cambios en el tamaño, relación superficie/volumen o curvatura, ante el ataque de antibióticos. También pueden modificar la estructura celular, como es el caso de la alteración en estructura y/o número de transpeptidasas involucradas en la construcción del peptidoglicano en la pared celular inducida por antibióticos como los β -lactámicos. Estos cambios pueden regular la concentración intracelular del antibiótico y/o disminuir su unión, inhibiéndolo total o parcialmente (Ojkic et al., 2022).

La resistencia a los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas ocurre mediante mutación de las subunidades ribosomales, metilación enzimática del ARN ribosomal o por la acción de enzimas de protección ribosomal. Por otro lado, las resistencias que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos son conferidas por la modificación o mutaciones de las girasas de ADN o de la topoisomerasa IV. Ambos casos de resistencias ocurren al reducir o eliminar la habilidad del antibiótico para unirse a estos componentes celulares (Reygaert, 2018).

En el caso de antibióticos que interfieren en rutas metabólicas, la resistencia es causada por mutaciones puntuales en los genes codificantes o, como se mencionó, por la modificación enzimática del sitio de unión del antibiótico. Estas mutaciones suelen estar localizadas cerca del sitio activo de las enzimas, ocasionando cambios estructurales que aún permiten la unión del sustrato, pero no del antibiótico. En algunos casos, la bacteria puede sobre producir el blanco del antibiótico e incluso reemplazarlo (Munita & Arias, 2016).

1.4. Resistencias intrínsecas

La resistencia intrínseca es un fenómeno natural que precede el uso terapéutico de los antibióticos. Es una característica universal de la especie bacteriana dentro del genoma, independiente de la presión selectiva del antibiótico y no es consecuencia de transferencia horizontal de genes. (Cox & Wright, 2013). Los mecanismos más frecuentes involucrados en la resistencia intrínseca son la reducida permeabilidad de la membrana (e.g. lipopolisacáridos en bacterias Gram negativas) y la actividad de bombas de eflujo. Algunos ejemplos de bacterias con resistencias intrínsecas son *E. coli* y *Serratia marcescens* con resistencia a macrólidos, *Klebsiella* spp. con resistencia a ampicilina y *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia natural a sulfonamidas, ampicilinas, cefalosporinas de 1era y 2da generación, cloranfenicol y tetraciclina (Reygaert, 2018).

1.5. Resistencia adquirida

La resistencia adquirida es un fenómeno de movilidad de material genético y puede ocurrir por 3 rutas: transformación, transducción y conjugación. Todas estas rutas son llamadas transferencia horizontal de genes y la adquisición puede ser temporal o permanente. La ruta más común es la adquisición de genes de resistencia mediados por plásmidos y la menos común es la transducción, en la que el vínculo de transferencia son los bacteriófagos. El material genético adquirido puede sufrir modificaciones internas: inserción de secuencias, movimiento a integrones y mutaciones.

Las mutaciones en genes de resistencia antimicrobiana suelen ocurrir en genes involucrados en la destrucción, modificación y transporte de los fármacos. Estas mutaciones pueden representar un costo metabólico para la bacteria y/o favorecer su persistencia. En ambos casos, las bajas o muy bajas concentraciones de antibióticos (concentraciones subinhibitorias) pueden favorecer la selección de resistencias de altos niveles en generaciones sucesivas de bacterias, aumentando la tasa de mutación de los genes y promoviendo la diseminación del material genético móvil (Reygaert, 2018).

1.6. Resistencias en el ambiente

Entre 40-90% de los antibióticos administrados son excretados a través de heces y orina a las aguas residuales. A estos, se suman los productos médicos que son mal dispuestos o descartados en los sistemas de alcantarillados. El destino final de estos desechos son las aguas superficiales, lo que se traduce en la introducción de grandes cantidades de antibióticos en el ambiente (Polianciuc et al., 2020). Por otra parte, la alta cantidad de antibióticos utilizados para la cría de animales de consumo genera una gran cantidad de residuos contaminantes que son vertidos directamente al medio e incluso utilizados como fertilizantes de cultivo. Así, a través de las aguas residuales, desechos agrícolas e incluso la escorrentía, se contaminan fuentes de aguas superficiales, suelo, plantas y animales.

Los ecosistemas acuáticos, en particular los ríos, son considerados los principales reservorios de residuos de antibióticos. Debido a que estos compuestos son persistentes, suelen acumularse y aumentar su concentración. Sin embargo, estas concentraciones ambientales suelen ser mucho más bajas que las concentraciones mínimas inhibitorias, lo que provoca un aumento del número de bacterias resistentes debido a la presión selectiva y la diseminación de elementos genéticos de resistencia (Grenni, 2022).

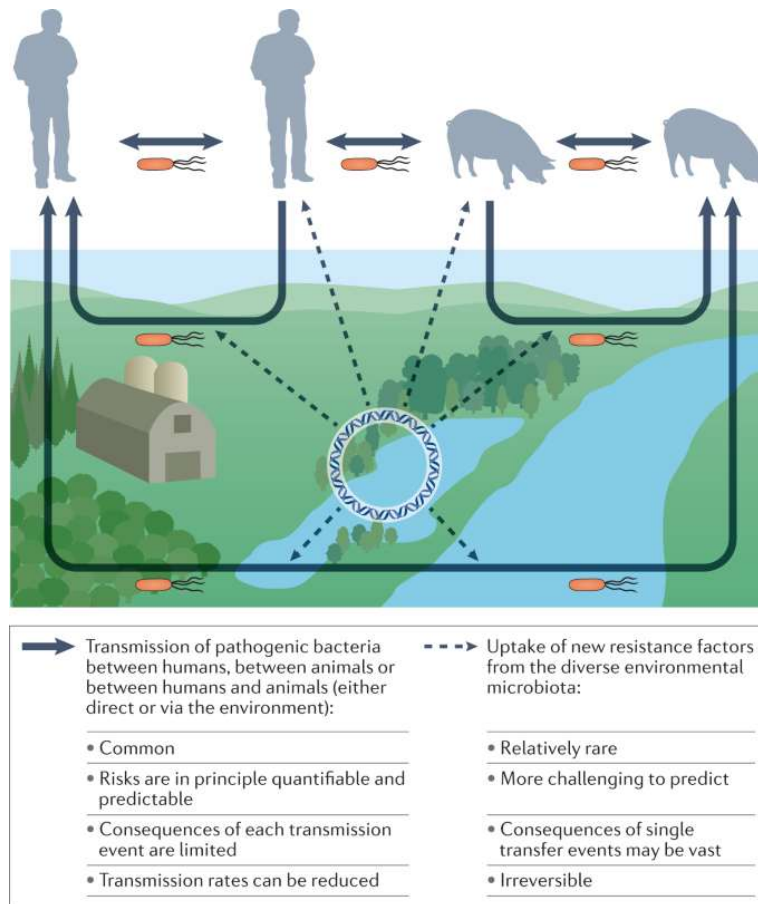


Figura 1. Rutas de transmisión de bacterias patógenas e intercambio genético en el ambiente.
Fuente: *Antibiotic resistance in the environment* (Larsson & Flach, 2022).

En muchos casos, la correlación entre la concentración de los antibióticos y la abundancia de genes de resistencia a los antimicrobianos puede ser explicada por diferentes niveles de contaminación con heces humanas, que es fuente de ambos, residuos de antibióticos y bacterias portadores de genes de resistencia. La contaminación ambiental con heces también provee contacto físico y aumenta la oportunidad para intercambio genético entre bacterias residentes en el ambiente y bacterias adaptadas al tracto intestinal de humanos o animales domésticos (Figura 1). Además, el ambiente puede proporcionar una ruta de exposición para que algunas bacterias patógenas resistentes colonicen o infecten huéspedes (Larsson & Flach, 2022).

1.7. Multirresistencia bacteriana

La multirresistencia bacteriana describe el fenotipo donde predominan resistencias a un gran rango de compuestos citotóxicos no relacionados en su estructura química o funcional. Usualmente, se define como la resistencia a 3 o más clases de antibióticos distintos. Suele ocurrir por la acumulación de genes de resistencias en plásmidos o transposones, donde cada gen codifica para un agente específico o la acción de bombas de eflujo que pueden bombear más de un tipo de antibiótico fuera de la célula (Nikaido, 2009).

1.8. Ribosoma como blanco de antibióticos

El ribosoma bacteriano es una de las maquinarias macromoleculares más conservadas y sofisticadas de la célula. Es un complejo formado por 3 cadenas de ARN (16S, 23S y 5S) y más de 50 proteínas que, juntas, conforman dos subunidades: la subunidad mayor (conocida como subunidad 50S, debido a su coeficiente de sedimentación) y la subunidad menor (30S). Las subunidades juntas forman el ribosoma 70S (Polikanov et al., 2018).

La función esencial del ribosoma es la síntesis de proteínas. Es el encargado de traducir la información genética codificada en el ARN mensajero (ARNm), producto de la transcripción del ADN. El proceso de traducción está altamente regulado y se divide principalmente en 4 pasos: iniciación, elongación, terminación y reciclado de los ribosomas (Lin et al., 2018). La subunidad 30S es la encargada de decodificar la información genética del ARNm, mientras que la subunidad 50S posee el sitio catalítico donde los aminoácidos son unidos para formar polipéptidos.

Existe un amplio rango de antibióticos que interfieren en la síntesis de proteínas al unirse a distintos centros funcionales del ribosoma, de forma que pueden hacer que el ribosoma no adquiera la conformación necesaria para la síntesis o al impedir la unión de ligandos. Estos antibióticos han sido empleados durante los últimos 70 años para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Polikanov et al., 2018). Debido a la función esencial del ribosoma, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para protegerse de la acción inhibitoria de estos antibióticos, entre los cuales se encuentran las mutaciones y modificaciones tanto en el ARNr como en las proteínas que lo conforman y la modificación enzimática de los antibióticos.

Las mutaciones del ARNr son los mecanismos de resistencia menos frecuentes, debido a que la mayoría de las bacterias tienen múltiples copias de ARNr. Las mutaciones suelen presentarse en bacterias con bajo número de copias de ARNr. Aunque las mutaciones no se encuentren directamente relacionadas con el sitio de unión del antibiótico, los cambios conformacionales reducen la afinidad de los antibióticos a las unidades ribosomales. En el caso de las mutaciones en el ARNr 16S, estas pueden conferir resistencia a antibióticos como la tetraciclina. Un caso particular de mutación del sitio de unión es la mutación debido a la metilación del ARNr mediado por metiltransferasas del ARNr.

Los mecanismos de resistencia más usuales y variados son los de inactivación enzimática. Sin embargo, la metilación de los nucleótidos del ARNr es, quizás, el mecanismo más básico y efectivo de la resistencia bacteriana a los antibióticos que tienen como diana el ribosoma (Osterman et al., 2020). Este mecanismo bloquea la acción de una gran variedad de antibióticos, con unas 8 clases distintas comúnmente usadas en medicina. Si bien estos antibióticos son utilizados para interferir en la función de síntesis de proteínas en el ribosoma, más de un antibiótico comparte parcialmente sitios de unión superpuestos, por lo que la metilación de un solo nucleótido puede ocasionar la resistencia a múltiples antibióticos (Schaenzer y Wright, 2020).

El papel más significativo de resistencia lo proporcionan las metiltransferasas (MTasas) del ARNr, que adicionan un grupo metilo a bases nitrogenadas o a la 2'-O-ribose del nucleótido objetivo del ARNr, utilizando S-adenosilmetionina (SAM) como cofactor (MTasas de clase I). Así, las bacterias adquieren altos y diversos espectros de resistencia a algunas clases de antibióticos que actúan mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S como los aminoglucósidos, tetraciclinas y tuberactinomicinas; o a los que se unen a la subunidad 50S como los macrólidos, anfenicoles, lincosamidas, estreptograminas, pleuromutilinas y oxazolidinonas, puesto que la metilación bloquea la unión del antibiótico a la diana correspondiente en el ribosoma (Schaenzer y Wright, 2020; Wachino *et al.*, 2020).

1.9. Antibióticos de unión a la subunidad ribosomal 30S

1.9.1. Aminoglucósidos

La clasificación de los aminoglucósidos está dada por su estructura química: la familia de aminoglucósidos se caracteriza por el núcleo aminociclitol (alcohol cíclico hexagonal con grupos aminos) unido a aminoazúcares a través de enlaces glucosídicos (Palomino & Pachón, 2003; Ramirez & Tolmasky, 2010). La familia de aminoglucósidos se clasifica de acuerdo con la presencia o ausencia del componente aminoazúcar unido al aminociclitol, sea estreptidina o desoxiestreptamina (Figura 2).

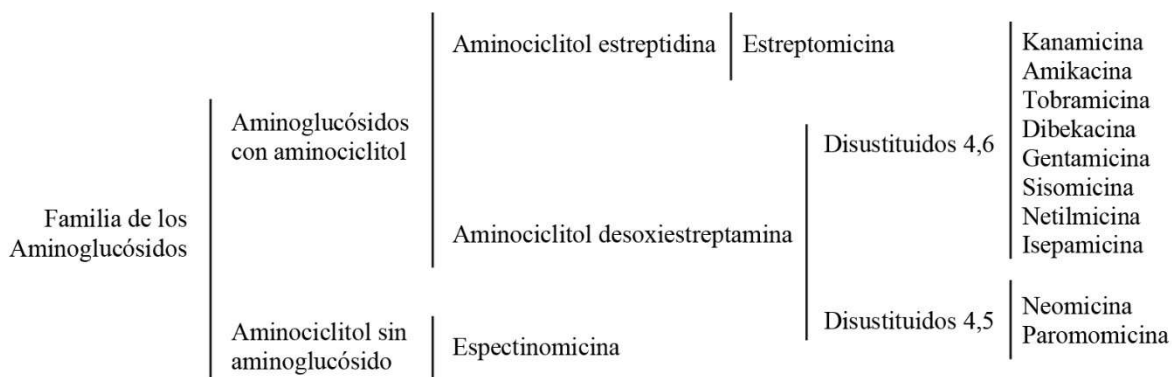


Figura 2. Clasificación de la familia de los aminoglucósidos. Adaptado de “Aminoglucósidos” (Palomino & Pachón, 2003).

Si bien, la denominación correcta de la familia sería “aminoglucósidos aminociclitoles”, es más común el uso de los términos aminoglucósidos, aminoglicósidos o aminósidos, siendo el primero el más extendido.

Los aminoglucósidos son utilizados para combatir infecciones causadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Es eficaz contra los miembros de las Enterobacteriáceas como *E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Providencia spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.*, y *Serratia spp.* Esta clase de antibióticos también ha demostrado eficacia contra patógenos de prioridad crítica como *Staphylococcus aureus* (incluyendo las metilcilina resistentes) y *Pseudomonas aeruginosa* vancomicina resistente (Krause et al., 2016).

Los aminoglucósidos se unen al ARNr causando problemas en la síntesis de proteínas. Estos antibióticos promueven errores en la codificación del ARNm, inhibe la translocación del ARNm-ARNt e inhibe el reciclaje de los ribosomas. El principal sitio de unión de los aminoglucósidos es la hélice 44 del ARNr, cerca del sitio A de la subunidad 30S. Esta unión induce la reorganización del sitio A, lo que incrementa los errores de codificación. En cambio, se desconoce los mecanismos por los cuales los aminoglucósidos inhiben la traslocación y reciclaje de los ribosomas; aunque, algunos estudios estructurales han revelado que la interacción de los aminoglucósidos en un segundo sitio de unión a la subunidad 50S en la hélice 69, podría ser crucial para la inhibición de la traslocación y el reciclaje.

El mecanismo más prevalente de modificación de aminoglucósidos son las enzimas modificadoras de antibióticos. La diseminación de estas enzimas está asociada a su presencia en elementos móviles y a la transferencia horizontal de genes. Se han descrito más de 100 enzimas modificadoras de aminoglucósidos y estas se categorizan dependiendo de su capacidad para añadir grupos acetil, fosforil, adenil o hidroxil en diferentes posiciones de la estructura de los aminoglucósidos. Estas modificaciones disminuyen la afinidad de los antibióticos al ARNr perdiendo su actividad antibiótica. Las principales familias son acetiltransferasas (AAC), adeniltransferasas (ANT) y fosfotransferasas (APH) (Krause et al., 2016; Zhang, Zhang, et al., 2023).

Las metilaciones en las posiciones G1405 y A1408 del ARNr 16S (normalmente en el N7 de guanina y N1 de adenina) confieren resistencia a varios aminoglucósidos: las MTasas G1405 (ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD y RmtE) confieren un alto nivel de resistencia a la amikacina, forticimina, gentamicina y tobramicina; mientras que la MTasa A1408 NpmA es extremadamente rara y, además, confiere resistencia a la apramicina (Tabla 2) (Lambert, 2012; Schaezner y Wright, 2020). Recientemente, se reportó la nueva metiltransferasa NpmC, con 92.7% de identidad a nivel aminoacídico con NpmA (Matamoros et al., 2024).

Tabla 2. Metiltransferasas del ARNr y su fenotipo de resistencia.

Familia	ARNr	Nucleótido^a	Posición metilada	Fenotipo de resistencia
Rmt	16S	G1405	N7	4,6-aminoglucósidos
Npm	16S	A1408	N1	4,6 y 4-5-aminoglucósidos ^b
Arm	16S	G1405	N7	4,6-aminoglucósidos

^a Según nomenclatura de *E. coli*.

^b Los 4,6-aminoglucósidos incluyen kanamicina, amikacina, tobramicina, dibekacina, gentamicina, entre otros; y los 4,5-aminoglucósidos incluyen las neomicinas.

1.9.2. Tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, espiroquetas e incluso parásitos protozoarios. Están formados por una fusión de núcleos tetracíclicos unidos (anillos designados A, B, C y D), los cuales pueden presentar una gran variedad de grupos funcionales (Figura 3). Estos núcleos unidos dan el nombre al grupo y son la característica más importante de estos compuestos como agentes antimicrobianos. Los compuestos derivados de la tetraciclina poseen diferentes sustituciones en las posiciones de los anillos, las cuales confieren diferentes propiedades quelantes en diferentes niveles de actividad antimicrobiana (Chopra & Roberts, 2001).

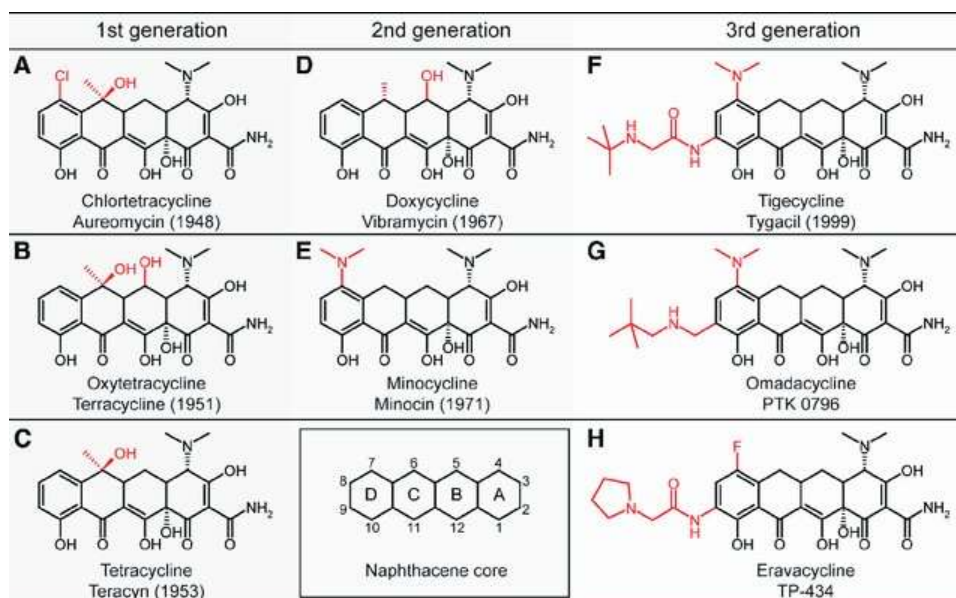


Figura 3. Familia de tetraciclinas. (A-C) tetraciclinas de primera generación, (D-E) tetraciclinas de segunda generación, (F-H) tetraciclinas de tercera generación y en el recuadro se observa el núcleo tetracíclico (naftaceno) que comparten las tetraciclinas.

La tetraciclina inhibe el crecimiento bacteriano al unirse a la subunidad ribosomal 30S y prevenir que el aminoacil-ARNt se una al sitio A (Adesoji et al., 2015). Estudios de la estructura cristalina de la subunidad 30S en complejo con la tetraciclina revelaron que el principal sitio de unión está localizado en la hélice 34 del ARNr 16S, superponiéndose con el tallo-bucle del sitio A-ARNt (Dönhöfer et al., 2012).

El amplio uso de la tetraciclina durante los últimos 60 años llevó al incremento de resistencias adquiridas entre patógenos de importancia clínica, limitando la utilidad de algunos miembros de esta clase. La resistencia a la tetraciclina se atribuye principalmente a la adquisición de genes que codifican para bombas de eflujo dependientes de energía o proteínas que protegen el ribosoma. Muchos de estos genes están asociados a plásmidos móviles o transposones. Un número muy limitado de bacterias adquieren resistencia debido a alteraciones en la permeabilidad de las porinas de la membrana externa y/o de los lipopolisacáridos, por cambios en los sistemas de eflujo innatos o mutaciones en el ARNr 16S (Roberts & Schwarz, 2009) y los mecanismos de inactivación enzimática son poco comunes en comparación con las bombas de eflujo o los factores de protección ribosomal (Gasparrini et al., 2020).

Una revisión del número de genes de resistencia asociados a esta clase de antibióticos resultó en, al menos, 37 genes de resistencia (Tabla 3). La mayoría codifican para bombas de eflujo (23 genes), proteínas de protección ribosomal (11) y enzimas de inactivación (3).

Tabla 3. Clasificación de los genes de resistencia a las tetraciclinas de acuerdo con su mecanismo de resistencia.

Bombas de eflujo	Protección ribosomal	Enzimática
<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(H), tet(J), tet(V), tet(Y), tet(Z), tet(30), tet(31), tet(33), tet(35), tet(39), tet(K), tet(L), tet(38), tetA(P), otr(B), otr(C), tcr3</i>	<i>tet(M), tet(O), tet(S), tet(W), tet(32), tet(Q), tet(T), tet(36), otr(A), tetB(P), tet</i>	<i>tet(X), tet(34), tet(37)</i>

Adaptado de *Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms* (Roberts & Schwarz, 2009).

Un ejemplo de alteración del ribosoma es el mecanismo de protección de los determinantes de resistencia a la tetraciclina Tet(M) y Tet(O). Estas proteínas separan la tetraciclina del ribosoma, dando como resultado un cambio conformacional que previene que el antibiótico vuelva a unirse. Esta interacción es el resultado de la competencia por el sitio de unión del antibiótico que altera el sitio de unión y permite que el ribosoma reanude la síntesis de proteínas (Munita & Arias, 2016).

1.9.3. Otros antibióticos de unión a la subunidad ribosomal 30S

Las tuberactinomicinas son otra familia de antibióticos cuyo blanco es el ribosoma. Son péptidos cíclicos conocidos por su utilidad como segunda línea en el tratamiento de cepas de tuberculosis resistentes a antibióticos. Aunque recientemente se han remplazado estos antibióticos por otras terapias de vía oral, la viomicina y capreomicina permanecen como potentes agentes antimicobacterianos. Estos antibióticos se unen a los nucleótidos A1492 y 1493 del ARNr 16S y previenen la translocación de los ribosomas (Laughlin & Conn, 2022).

1.10. Antibióticos de unión a la subunidad ribosomal 50S

1.10.1. Macrólidos

Los macrólidos están formados por un anillo lactónico macrocíclico con uno o varios azúcares unidos. Dependiendo del número de elementos contenidos en el anillo, se clasifican en: macrólidos de 14 átomos de carbono (como eritromicina, claritromicina, roxitromicina), macrólidos de 15 átomos de carbono (como azitromicina), macrólidos de 16 átomos de carbono (como espiramicina, josamicina, midecamicina) y se adiciona un nuevo grupo derivado de la eritromicina, los cetólidos, en los que el azúcar unido al carbono 3 se sustituye por un grupo cetónico (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

Los macrólidos son una de las familias de antibióticos más utilizados en medicina, siendo la azitromicina el más popular alrededor del mundo. Son especialmente conocidos por su actividad contra patógenos Gram-positivos, aunque también es utilizado para tratar infecciones por Gram-negativos como *Bordetella pertussis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia spp.* y *Campylobacter spp.* Generalmente, la azitromicina se utiliza para el tratamiento de diferentes enfermedades diarreicas e infecciones sistémicas causadas por

enterobacterias como *Shigella* spp. y *Salmonella typhi* e incluso ha sido usada para disgregar biopelículas producidas por patógenos Gram-negativos no fermentadores, como *Pseudomonas* spp. (Paul et al., 2023).

Todos los macrólidos inhiben la síntesis de proteínas de las bacterias al unirse al ARNr 23S de la unidad ribosomal 50S. Los macrólidos/cetólidos se unen de forma reversible al dominio V del centro peptidiltransferasa, bloqueando el orificio de entrada al túnel ribosómico, donde sale la proteína en formación (Fyfe et al., 2016).

El amplio uso de los macrólidos ha llevado a la aparición de bacterias resistentes a estos antibióticos. Los mecanismos de resistencia incluyen mutaciones en el ARNr 23S por sustitución de las bases. Debido a que los macrólidos interactúan principalmente con los nucleótidos A2058 y A2059 del ARNr 23S, las mutaciones en estos sitios confieren resistencia a los macrólidos, lincosamidas, estreptogramina B y cetólidos (grupo conocido como MLSK). Otro tipo de mutación puede ser encontrado en los genes que codifican las proteínas ribosomales L4 y L22; sin embargo, estas mutaciones alteran el correcto ensamblaje y funcionamiento de los ribosomas, dando como resultado la reducción de las tasas de crecimiento de las bacterias y la acumulación de subunidades ribosomales anormales (Zaman et al., 2007).

Los mecanismos enzimáticos de inactivación de los macrólidos también son significativos y son llevados a cabo por 2 clases de enzimas: fosfotransferasas de macrólidos y esterazas de macrólidos. Las primeras modifican la estructura de los anillos lactónicos de los macrólidos de 14, 15 y 16 carbonos al introducir un grupo fosfato al segundo grupo hidroxilo del amino azúcar del macrólido, que eventualmente inhibe la interacción del antibiótico con el A2058. Los 7 genes de fosfotransferasas de macrólidos descritos son *mphA*, *mphB*, *mphC*, *mphD*, *mphE*, *mphF* y *mphG*, siendo *mphA* el más prevalente entre las Enterobacteriaceas. Con respecto a las esterazas, estas hidrolizan los antibióticos con anillo de 14 y 15 carbonos, siendo el gen *ereA* el más extendido entre Enterobacterias (Paul et al., 2023).

Sin duda, el mecanismo más prominente es la modificación del sitio de unión de los macrólidos, mediante la metilación del ARNr 23S. La metilación y dimetilación en la posición A2058 del ARNr 23S causada por enzimas Erm confiere baja y alta resistencia, respectivamente, a los macrólidos, aunque también se incluyen los otros antibióticos del grupo MLS (Tabla 4) (Lambert, 2012; Schaenzer y Wright, 2020). La metilación/dimetilación interrumpe la unión del antibiótico al impedir la formación de un puente de hidrógeno con el A2058 (Osterman et al., 2020).

Tabla 4. Metiltransferasas de la familia Erm y su fenotipo de resistencia.

Familia	ARNr	Nucleótido ^a	Posición metilada	Fenotipo de resistencia
Erm (ErmC)	23S	A2058	2xN6	MLS ^c
Erm (ErmN)	23S	A2058	N6	Lincosamidas

^a Según nomenclatura de *E. coli*.

Otro mecanismo importante para la evasión de la acción de los macrólidos es la reducción de la concentración intracelular mediante proteínas de eflujo que pueden transportar las moléculas del interior al exterior de la célula. Entre las bombas de eflujo asociadas a macrólidos se encuentran la superfamilia MFS (del inglés, *major-facilitator-superfamily*), los transportadores ABC (dependientes de ATP), RND (del inglés, *Resistance-Nodulation-Division*). Algunos genes de estas bombas están asociados con elementos genéticos móviles, como es el caso de los genes *mef(A)* y *mef(E)* que codifican MefA y MefE, de la familia de las bombas MFS; y, las bombas codificadas por los genes *msr*, de la familia de los transportadores ABC, que codifican las proteínas msrA, msrC, msrD y msrE (Paul et al., 2023).

1.10.2. Anfenicoles

Los anfenicoles son una clase de antibióticos de amplio espectro. Estos son compuestos organoclorados que incluyen el cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol (Figura 4). Estos antibióticos son efectivos contra Gram-positivos, Gram-negativos e incluso contra algunos virus. Son ampliamente utilizados en el tratamiento y control de infecciones bacterianas en animales de consumo por su amplia disponibilidad y bajo costo; sin embargo, no son tan utilizados en medicina humana (a excepción del tianfenicol) debido a algunos efectos secundarios como mielosupresión, anemia aplásica, náuseas y diarrea (Du et al., 2020; Zhou et al., 2023).

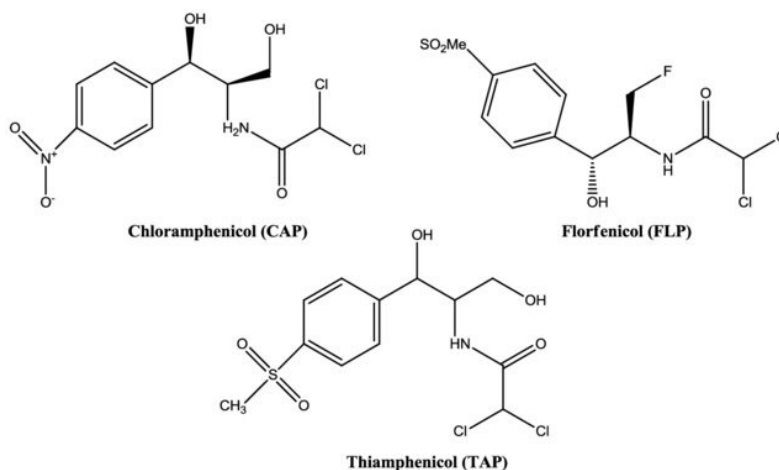


Figura 4. Estructura química del cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol.

El cloranfenicol ha sido su principal representante. Este actúa uniéndose reversiblemente a la subunidad ribosomal 50S, de forma que bloquea la actividad transpeptidasa e interfiere con la unión del amino-ARNt a la subunidad; así, inhibe la formación de nuevas cadenas peptídicas y detiene la síntesis de proteínas de la bacteria (Du et al., 2020). Además, el cloranfenicol inhibe el ensamblaje del ribosoma, debido a que produce una desregulación en el equilibrio entre la producción de ARNr y proteínas ribosomales (Yu & Zeng, 2024).

Los mecanismos de resistencia a cloranfenicol más presentes son las acetiltransferasas del cloranfenicol (CATs), de las que se reportan 2 familias de enzimas no relacionadas genéticamente. Además, la resistencia puede ser conferida por transportadores de membrana que secretan el antibiótico al medio extracelular. Otros mecanismos de resistencia pueden incluir la reducción de proteínas de membrana (cambio en la permeabilidad celular), mutaciones en el ARNr 23S, inactivación por 3-O-fosfotransferasas y por la modificación del sitio de unión al ARNr 23S mediado por metiltransferasas (Roberts & Schwarz, 2009).

Se han descrito alrededor de 22 grupos de CATs. Las estructuras de las CATs suelen ser homotrimérica, es decir, estructuras triméricas compuestas por monómeros idénticos. Todas las CATs transfieren un grupo acetyl de una molécula donadora (usualmente acetyl-CoA) a la posición C3 del cloranfenicol, para luego ser movido a la posición C1 y repetir la acetilación en C3. El cloranfenicol mono o di acetilado no tiene actividad antimicrobiana. Estas enzimas no inactivan el florfenicol debido a que la posición C3 está fluorada y no puede aceptar un grupo acetyl en esa posición (Roberts & Schwarz, 2009).

Otros mecanismos de resistencia a los anfenicoles incluyen transportadores de membrana. Se han descrito unos 11, entre los que se encuentra el gen *floR*, que codifica para una proteína transmembrana capaz de conferir resistencia tanto al cloranfenicol como al florfenicol y se asocia a plásmidos (P. Li et al., 2020). Algunas proteínas de membrana no son específicas para el transporte de anfenicoles y también confieren resistencia a múltiples antibióticos de otras clases. Ejemplos de estas proteínas son MdfA (confieren resistencia a eritromicina, algunos aminoglucósidos y fluoroquinolonas) y bombas de eflujo de la superfamilia RND (confieren resistencia a ácido fusídico, fluoroquinolonas, tetraciclinas, novobiocina y algunos β -lactámicos) (Nasrollahian et al., 2024).

El único gen de metiltransferasa del ARNr conocido, que confiere resistencia a los anfenicoles, es el gen *cfr*. Este gen codifica la metiltransferasa Cfr, que metila el nucleótido A2503 (según nomenclatura de *E. coli*) en la posición C-8 (Aleksandrova et al., 2024). Esta modificación también puede conferir resistencia a otros antimicrobianos que comparten o se sobreponen en el mismo sitio de unión en el ARNr 23S como fenoles, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptograminas A. Este gen se ha identificado en elementos genéticos móviles como transposones y está distribuido tanto en Gram-positivos como Gram-negativos (Tang et al., 2022).

1.10.3. Otros antibióticos de unión a la subunidad ribosomal 50S

Las lincosamidas, estreptograminas A, pleuromutilinas y oxazolidinonas son antibióticos que tienen como blanco la subunidad ribosomal 50S. Estos antibióticos tienen un sitio de unión común, el centro peptidiltransferasa y la salida del túnel ribosómico. Las estreptograminas B, en cambio se unen a los sitios adyacentes al inicio de la salida del túnel. Al igual que los macrólidos, los mecanismos de inhibición de estos antibióticos suele estar mediados por familias de bombas de eflujo y transportadores de membrana (Crowe-McAuliffe et al., 2021).

1.11. Aptámeros

1.11.1. Clasificación, estructura y aplicación de los aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos de ADN o ARN de cadena sencilla que se pliegan en arquitecturas definidas y se unen a blancos específicos (Keefe et al., 2010). El tamaño de los aptámeros no se ha establecido, pero se han descrito aptámeros en el rango de 15 – 100 nucleótidos, con la característica de formar complejas estructuras terciarias o cuaternarias, capaces de unirse a sus dianas con una afinidad en el rango de micro – pico molar, comparable a la de los anticuerpos (Khan et al., 2022).

Los aptámeros típicamente constan de una región aleatoria flanqueada por dos regiones constantes que permiten la amplificación por PCR por complementariedad de cebadores. En teoría, la región aleatoria es única para cada aptámero, por lo que, una librería de aptámeros de región aleatoria de 40 nt tendría unas 4^{40} o $\sim 10^{24}$ secuencias únicas; aunque las librerías usualmente contienen entre 10^{14} - 10^{15} secuencias únicas (L. F. Yang et al., 2023). Esto se debe a que, matemáticamente, existen 4^{40} posibles secuencias únicas (4 nucleótidos, 40 posiciones) pero el número predicho de estructuras es inferior debido a que existen 2 posibles combinaciones de enlaces (el enlace A-T = T-A, lo mismo con los enlaces C-G).

Si bien, los aptámeros pueden estar formados por ADN o ARN, las investigaciones iniciales se enfocaron al desarrollo de aptámeros de ARN. Esto se debe a que los aptámeros de ARN tienden a formar estructuras más pequeñas que los aptámeros de ADN, que pueden entrar con mayor facilidad a la célula. Además, los aptámeros de ARN se pliegan en una vasta variedad de estructuras terciarias que interactúa con mayor afinidad y especificidad a blancos. Además, la flexibilidad estructural y mimetismo molecular de la cadena sencilla de oligonucleótidos promovió su uso en un rango de aplicaciones incluyendo diagnóstico y tratamiento de enfermedades, así como en el desarrollo de los moduladores de procesos biológicos, biosensores para la detección de contaminantes ambientales y en el control de calidad de procesos industriales y alimenticios (Adachi & Nakamura, 2019; Ni et al., 2021).

Los aptámeros, similar a los anticuerpos monoclonales, actúan como inhibidores que pueden interferir con la función normal de una proteína. Estos presentan algunas ventajas en cuanto a estabilidad, obtención, tamaño, afinidad y demás (Tabla 5); sin embargo, a diferencia de los anticuerpos monoclonales, los aptámeros son susceptibles a la hidrólisis por nucleasas y la rápida filtración glomerular (eliminación por los riñones).

Tabla 5. Comparación de aptámeros y anticuerpos monoclonales.

	Aptámeros	Anticuerpos monoclonales
Estabilidad	Soportan repetidas rondas de desnaturalización/renaturalización Son estables a temperatura ambiente Son estables en diferentes condiciones de pH Larga vida útil (varios años) Pueden liofilizarse Resistentes a proteasas	Se desnaturalizan fácilmente. Requieren refrigeración para evitar su desnaturalización La estabilidad depende del pH y estructura Vida útil limitada Resistentes a nucleasas
Obtención	2-8 semanas por SELEX <i>in vitro</i> No varían por lotes Bajo costo de síntesis (~\$50/mg)	Más de 6 meses por producción <i>in vivo</i> Varían por lotes Producción costosa (~\$2000-\$5000)
Blancos potenciales	Desde iones y moléculas pequeñas hasta células enteras y animales	Los blancos deben causar una fuerte respuesta inmune para ser producidos
Tamaño	Moléculas pequeñas	Relativamente grandes en comparación con los aptámeros
Capacidad de modificación	Pueden ser modificados fácilmente sin pérdidas de afinidad	Las modificaciones usualmente reducen la actividad
Afinidad	Alta y se incrementa en aptámeros multivalentes	Depende del número de epítomos en el antígeno
Filtración por riñones	Rápida	Lenta

Adaptado de “Recent progress in aptamer discoveries and modifications for therapeutic applications” y “Aptamers 101: aptamer discovery and *in vitro* applications in biosensors and separations” (Ni et al., 2021; L. F. Yang et al., 2023).

Algunas estrategias han sido adoptadas para aumentar la resistencia a las nucleasas y aumentar la afinidad de los aptámeros. Éstas incluyen modificaciones químicas de la ribosa o de los enlaces fosfodiéster, la inclusión de nucleótidos artificiales, el uso de L-nucleótidos (“*spiegelmers*”, aptámeros con estructura quiral), la adición de un cap en el extremo 3’ y truncar los aptámeros a la mínima longitud posible para reducir interacciones inesperadas. Algunas estrategias como la adición de polietilenglicol o la unión de colesterol en el extremo 5’ han sido utilizadas en aptámeros con fines terapéuticos para aumentar su masa molecular, evadir los sistemas de filtración del cuerpo y mejorar la absorción de la célula (Adachi & Nakamura, 2019; Ni et al., 2021). Estas modificaciones deben ser utilizadas apropiadamente para evitar la toxicidad de los agentes, mantener el efecto terapéutico deseado y evitar respuestas alérgicas.

1.11.2. SELEX

A pesar de todas las posibles aplicaciones de los aptámeros, los procedimientos para el aislamiento y selección eran tediosos y requerían de muchos recursos. Para lidiar con estos inconvenientes, aparecieron nuevas tecnologías innovadoras como la Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*, por sus siglas en inglés SELEX) (Khan et al., 2022; Wu & Kwon, 2016). Este método permite el aislamiento de aptámeros con capacidad de unión selectiva a la diana de interés, mediante repetidas rondas de selección y amplificación por PCR.

El método se basa en ciclos iterativos de unos 5 pasos: incubación, unión, lavado, elución y amplificación. El proceso inicia con una librería de aptámeros de cadena sencilla de ADN/ARN con secuencias aleatorias (en algunos casos flanqueadas por secuencias fijas). Cada secuencia es capaz de conformar una estructura tridimensional que, es en teoría, única. Al inicio de cada ciclo, la librería es incubada con el blanco de interés. Debido al alto número de secuencias únicas es probable que alguna de las moléculas se una al blanco con alta especificidad y afinidad. Las secuencias de baja afinidad son removidas de las soluciones y se eluyen las secuencias de interés. Estos aptámeros seleccionados son amplificados (en el caso de los aptámeros de ARN, amplificados y posteriormente transcritos) y utilizados como las nuevas librerías para iniciar los ciclos. Eventualmente, los aptámeros con mayor afinidad permanecerán en el sistema (Hoinka et al., 2014).

1.11.3. Interacciones aptámero-proteína

La estructura terciaria de los aptámeros reconoce a su blanco específico por medio de enlaces de hidrógeno, interacciones van der Waals, complementariedad de la forma molecular, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, el apilamiento de moléculas aromáticas o la combinación de estos. Se considera que de éstos, los principales factores que determinan la especificidad de la interacción son la complementariedad de la forma y el potencial electrostático; sin embargo, los enlaces de hidrógeno, puentes salinos e interacciones de apilamiento juegan un papel importante en la estabilización de las interfaces del ARN-proteína (Shraim et al., 2022).

Los aptámeros prefieren interactuar con las superficies positivamente cargadas de las proteínas diana. Estas interacciones electrostáticas son el resultado de la naturaleza electronegativa de los grupos fosfato del ARN y de aminoácidos positivamente cargados de la proteína. Esto es particularmente cierto para las interacciones con proteínas que no tienen ácidos nucleicos como ligandos naturales; y, los aptámeros que se unen a proteínas que tiene ácidos nucleicos como ligandos naturales suelen demostrar mimetismo molecular (se pueden unir al mismo sitio e imitar el modo de interacción). Además de las interacciones electrostáticas, los aptámeros pueden mostrar un comportamiento comparable al de los anticuerpos al unirse a superficies sin cargas, si estas son complementarias a su forma (Adachi & Nakamura, 2019; Bjerregaard et al., 2016; Shraim et al., 2022).

1.11.4. Aptámeros como inhibidores

La idea de utilizar ácidos nucleicos para inhibir la actividad enzimática se basa en los mecanismos celulares natos, donde la célula regula la actividad de procesos metabólicos a través de distintos tipos de ARN (Planson et al., 2020). Los aptámeros, al unirse con gran afinidad a ligandos de proteínas pueden ser utilizadas para regular o inhibir la actividad de enzimas.

La mayoría de los aptámeros que se unen e inhiben proteínas usualmente son producidas con la metodología SELEX (Keefe et al., 2010). Con esta tecnología también son producidos los *riboswitches*, que son estructuras de ARN no codificante utilizado para regular la expresión génica al unirse con sus ligandos blancos (Kavita & Breaker, 2023). Así, se han descrito una cantidad interesante de estudios que respaldan el uso de los aptámeros como inhibidores.

Los aptámeros han sido utilizados para la inhibición de distintas proteínas entre las que se han publicado la (i) fosfatasa de tirosina (PTP1B), relacionada con la diabetes tipo 2, cáncer de seno y obesidad (Townshend *et al.*, 2010); (ii) proteasa VIH-1, perteneciente al virus de inmunodeficiencia humana (Duclair *et al.*, 2015); (iii) tripsina, utilizada en investigación y aplicaciones médicas (Malicki *et al.*, 2019); (iv) endonucleasa de restricción, utilizadas por las bacterias para protegerse contra la invasión de ADN foráneo y comúnmente utilizadas en aplicaciones de biología molecular (Mondragón & Maher, 2015); (v) elastasa de neutrófilos humana, con actividad en el sistema de inmunidad nato, en la inflamación y la remodelación de tejido (Malicki et al., 2023) e inhibición de muchos otros blancos asociados a desórdenes oculares, trombosis, desórdenes vasculares e incluso contra el cáncer (Nimjee et al., 2017).

Capítulo 2. Metodología

2.1. Colecta de muestras y fuentes de agua

Se colectó una muestra de agua residual cruda en la entrada de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de la Ciudad de Panamá ($9^{\circ} 0'59.69''\text{N}$, $79^{\circ}26'47.86''\text{O}$). Otra muestra se colectó en el río Juan Díaz ($9^{\circ} 1'7.17''\text{N}$, $79^{\circ}26'13.05''\text{O}$). Los puntos de muestreo se encontraban aproximadamente a 1 km de distancia entre ellos (Figura 5). Ambas muestras se mantuvieron a 4°C durante su almacenaje y transporte al laboratorio, y fueron procesadas en un tiempo no superior a las 6 horas postcolecta.

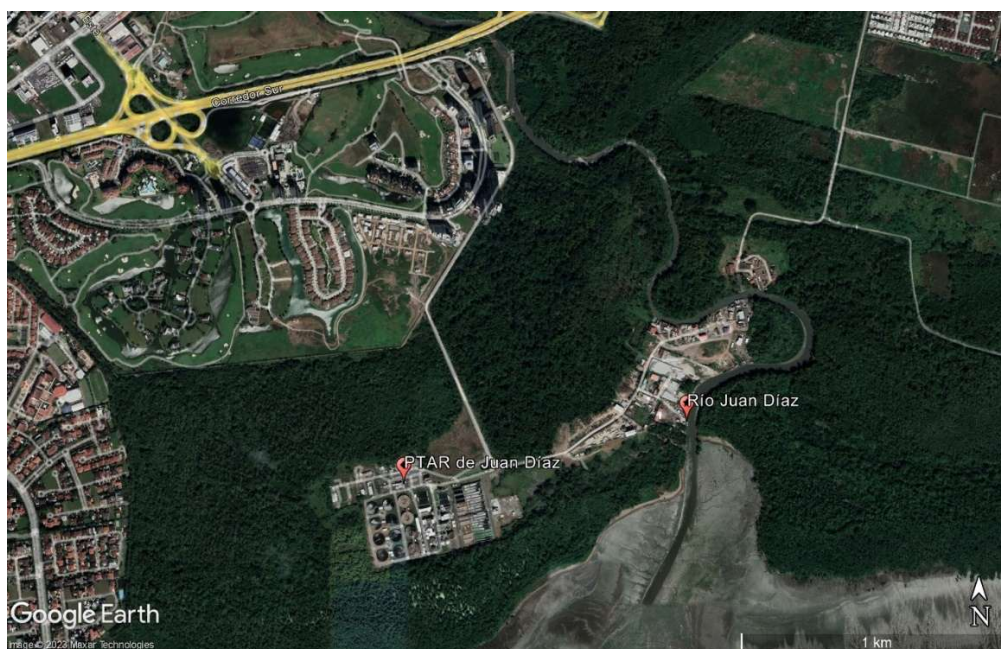


Figura 5. Localización de puntos de colecta de muestras de agua.

2.2. Detección y aislamiento de *E. coli*

La detección de *E. coli* se realizó según el manual *Microbiological Examination of Water and Wastewater* (Csuros & Csuros, 1999) basándose en la capacidad de esta bacteria para fermentar lactosa. El método también confirma la identidad de *E. coli* basado en su actividad β -D-glucuronidasa (GUR). El procedimiento realizado fue el siguiente:

1. Se inoculó 1 ml de muestra de agua en un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de caldo lauril-triptosa y con campana Durham que se incubó a 37°C durante 24 horas.
2. De los tubos positivos (crecimiento y presencia de gas) se transfirió 1 ml a tubos con 9 mL de caldo bilis verde brillante con campana Durham el cual se incubó a 44.5°C durante 24 horas.
3. Con asa bacteriológica, se estriaron platos de agar eosina-azul de metileno (EMB) a partir de los tubos positivos de caldo bilis verde brillante (aquellos que presentaban

crecimiento y presencia de gas). Los platos se incubaron a 37°C durante 24 horas para purificar y aislar *E. coli* presuntivas.

4. Las colonias que presentaron brillo verde metálico con centro oscuro en el agar EMB fueron inoculadas en tubos de ensayo con campana Durham conteniendo 10 ml de caldo EC-MUG. El cultivo se incubó a 37°C durante 24 horas.
5. Se confirmó la identidad de los cultivos por fluorescencia bajo luz ultravioleta.

2.3. Confirmación molecular de *E. coli*

La confirmación molecular de los aislados se basó en la detección específica de los genes *cyd*, *lacY*, *uidA*, y *lacZ* (codificando para el complejo citocromo bd, lactosa permeasa, β-D-glucuronidasa y β-D-galactosidasa, respectivamente) mediante PCR Multiplex (Horakova et al., 2008). Se verificaron las condiciones óptimas de amplificación para los cebadores utilizados mediante un gradiente de temperatura de hibridación entre 56.4 °C - 58.8 °C. Se verificó la amplificación inicial de los genes utilizando 0.5 μM de cada cebador y se ajustaron las concentraciones a 0.2 μM, según fue necesario. Las secuencias de cebadores utilizados y tamaño de los productos de amplificación se detallan en la Tabla 6. Se utilizó como control de amplificación las cepas de *E. coli* DH5α y diferentes aislados verificados previamente mediante el sistema VITEK. Los productos de amplificación fueron cargados en geles de agarosa al 1.8% y corridos en tampón TBE 1X a 80V. Los fragmentos fueron visualizados con un transiluminador UV.

Tabla 6. Listado de cebadores utilizados en la PCR Multiplex de confirmación de *E. coli*.

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Producto (bp)
<i>uidA</i>	uidA-F	ATCGGCGAAATTCCATACCTG	319
	uidA-R	GTTCTGCGACGCTCACACC	
<i>lacZ</i>	lacZ-F	ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC	264
	lacZ-R	GGTTTATGCAGCAACGAGACGTCA	
<i>cyd</i>	cyd-F	CCGTATCATGGTGGCGTGTGG	393
	cyd-R	GCCGGCTGAGTAGTCGTGGAAG	
<i>lacY</i>	lacY-F	ACCAGACCCAGCACCAGATAAG	463
	lacY-R	GCACCTACGATGTTTTTGACCA	

2.4. Ensayo de susceptibilidad a antibióticos dirigidos a ribosoma

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de los antibióticos se determinó mediante ensayos de microdilución en placa en caldo Mueller-Hinton bajo un rango de diluciones establecidas con referencia al valor de corte epidemiológico (ECOFF) del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST). Para ello, las cepas fueron estriadas en agar LB suplementado e incubadas a 37°C O/N para obtener colonias frescas. Las células se resuspendieron en solución salina hasta alcanzar una turbidez de 0.5

McFarland. A continuación, se realizó una dilución 1:100 en caldo Mueller Hinton. En paralelo, se prepararon placas de 96 pocillos con 100 µl de caldo Mueller Hinton suplementado con un antibiótico, cuya concentración final máxima era 4 veces el valor de corte y ésta se diluía sucesivamente a la mitad, para un total de 8 concentraciones (Tabla 7) y se inocularon 100 µl de la suspensión de células indicada anteriormente en cada uno de los pocillos. Las placas se incubaron por 24h a 37°C y se registró, mediante inspección visual de la turbidez del medio, que pocillos no presentaban crecimiento bacteriano. Se utilizó la cepa de *E. coli* ATCC 25922 como control de calidad para la determinación de las MICs, según se establece en las guías del EUCAST y CLSI (CLSI, 2020; EUCAST, 2024).

Tabla 7. Rangos de dilución y valores de referencia para pruebas de microdilución.

Antibiótico	Rango de dilución (µg/ml)	EUCAST (mg/L) ^a	Punto de corte CLSI (mg/L) ^b
Amikacina	1 – 128	8	≥64
Tobramicina	0.5 – 64	4	≥16
Kanamicina	1 – 128	8	≥64
Gentamicina	0.25 – 32	2	≥16
Neomicina	1 – 128	8	-
Estreptomicina	2 – 256	16	-
Eritromicina	16-2048	-	-
Cloranfenicol	2-256	16	≥32
Tetraciclina	1-128	8	≥16

^a ECOFF = Valor de corte epidemiológico (en inglés “*epidemiological-cut-off value*”).

^b Punto de corte para la categoría de resistente: hace referencia a aquellas cepas que representan un riesgo de fallo terapéutico.

2.5. Extracción de ADN genómico de *E. coli*

El ADN genómico fue extraído a partir de colonias frescas de *E. coli* crecidas en agar Luria-Bertani (LB). Se resuspendió una colonia en 100 µl de agua de grado molecular y se hirvió por 5 min. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min para precipitar los restos celulares y el sobrenadante conteniendo el ADN se almacenó a -20°C. Salvo se indique lo contrario, el ADN molde utilizado en las reacciones de PCR corresponde al sobrenadante mencionado en este apartado.

2.6. Detección molecular de genes de resistencia a los antibióticos.

a) Aminoglucósidos

La detección de genes de resistencia a los aminoglucósidos se realizó mediante PCR. Los genes objetivo incluían enzimas modificadoras de aminoglucósidos: acetiltransferasas del grupo *aac(3)* y *aac(6)*; adeniltransferasas (también conocidas como nucleotidiltransferasas) del grupo *ant(2'')*, *ant(3'')* y *ant(4')*; fosfotransferasas del grupo *aph(3')* y *aph(3'')*; y metiltransferasas del ARN ribosomal 16S: *armA*, *npmA* y grupo *rmt*.

Para la reacción de PCR se utilizó Colorless GoTaq Master Mix 1X (Promega), 0.5 µM de cada primer, 1 µL de ADN molde, para un volumen final de 10 µL. Las condiciones de amplificación para la detección de los genes de resistencia a los aminoglucósidos fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguidos por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación a 55°C por 30 s [excepto *aac(6)* que hibrida a 60°C] y extensión a 72°C por 1 min. Las secuencias de los cebadores y tamaño de los productos de PCR se detallan en la Tabla 8. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidos con SybrSafe.

Tabla 8. Secuencia de cebadores para la detección de genes de resistencia a aminoglucósidos (Fernández-Martínez et al., 2015).

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Producto (bp)
<i>aac(3)-Ia</i>	aac3-Ia-F	GCAGTCGCCCTAAAACAAA	464
	aac3-Ia-R	CACTTCTTCCCGTATGCCCAACTT	
<i>aac(3)-IIa</i>	aac3-IIa-F	GGCAATAACGGAGGCGCTTCAAAA	563
	aac3-IIa-R	TTCCAGGCATCGGCATCTCATACG	
<i>aac(3)-IVa</i>	aac3-IVa-F	TCGGTCAGCTTCTCAACCTT	314
	aac3-IVa-R	GATGATCTGCTCTGCCTGTG	
<i>aac(6')-Ib</i>	aac6-Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482
	aac6-Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	
<i>ant(3'')-Ia</i>	ant(3'')-Ia-F	TCGACTCAACTATCAGAGG	245
	ant(3'')-Ia-R	ACAATCGTGACTTCTACAGCG	
<i>aph(3')-Ia</i>	aph(3')-Ia-F	CGAGCATCAAATGAAACTGC	625
	aph(3')-Ia-R	GCGTTGCCAATGATGTTACAG	
<i>aph(3'')-Ia</i>	aph(3'')-Ia-F	CGGCGTGGGCGGCGACTG	557
	aph(3'')-Ia-R	CCGGATGGAGGACGATGTTGG	
<i>aph(3'')-Ib</i>	aph(3'')-Ib-F	GTGGCTTGCCCCGAGGTCATCA	612
	aph(3'')-Ib-R	CCAAGTCAGAGGGTCCAATC	
<i>aph(6)-Id-</i>	aph(6)-Id-F	TCGCACCTGCTTGATCGCGG	586
	aph(6)-Id-R	GCTCGAATATGCCGGGGAGCG	
<i>rmtA</i>	rmtA-F	CTAGCGTCCATCCTTTCTC	635
	rmtA-R	TTTGCTTCCATGCCCTTGCC	
<i>rmtB</i>	rmtB-F	ACTTTTACAATCCCTCAATAC	171
	rmtB-R	AAGTATATAAGTTCTGTTCCG	
<i>rmtC</i>	rmtC-F	CGAAGAAGTAACAGCCAAAG	711
	rmtC-R	ATCCCAACATCTCTCCCACT	
<i>armA</i>	armA-F	ATTTTAGATTTTGGTTGTGGC	101
	armA-R	ATCTCAGCTCTATCAATATCG	
<i>npmA</i>	npmA-F	CTCAAAGGAACAAAGACGG	641
	npmA-R	GAAACATGGCCAGAAACTC	

b) Anfenicoles

La detección de genes de resistencia a los anfenicoles se realizó mediante PCR dirigida a genes de cloranfenicol acetiltransferasas (*Cat*) y el gen de resistencia a florfenicol (*floR*). Para la reacción de PCR se utilizó Colorless GoTaq Master Mix 1X (Promega), 0.5 µM de cada primer, 1 µL de ADN molde, para un volumen final de 10 µL. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación a 62°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s. Las secuencias de los cebadores y tamaño de los productos de PCR se detallan en la Tabla 9 (Williams et al., 2019). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

Tabla 9. Secuencia de cebadores para la detección de genes de resistencia a cloranfenicol.

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Producto (bp)
<i>CatA1</i>	catA1-F catA1-R	AATAAGATCACTACCGGGCGT GCAACTGACTGAAATGCCTCA	150
<i>CatA2</i>	catA2-F catA2-R	ACCCATTGAGACAACCAGACT CGATTCCAGGTATTCAGGTCAA	106
<i>CatA3</i>	catA3-F catA3-R	CGGCATCGTTTACCATGTG TCAAATTGATTACGCGCCTGA	137
<i>CatB2</i>	catB2-F catB2-R	AGGAAGCGCTTTTCTGAAGAA GCAATGCCAGACGAACAAAGA	113
<i>Grupo CatB: CatB3, CatB4, CatB5, CatB6, CatB8</i>	CatB-F CatB-R	GACTGGGYAWCATCYTTCCC CACCAACGAKCGRCTRCT	185
<i>Grupo cmlA: cml, cmlA1, cmlA3, cmlA4, cmlA5, cmlA6, cmlA7</i>	cmlA-F cmlA-R	ACGGCATACTCGGATCCATG CTTAACGGGGAGTAGCAGCT	212
<i>floR</i>	floR-F floR-R	ATGGCTCCTTTCGACATCCT CAAGTAGAATTGGCCGTCGC	196

c) Tetraciclina

La detección de genes de resistencia a tetraciclina se realizó mediante PCR múltiplex. La secuencia y producto de amplificación de cada par de cebadores se detalla en la Tabla 10 (Ng et al., 2001; Perewari et al., 2022). Para la reacción de PCR se utilizó Colorless GoTaq Master Mix 1X (Promega), 0.5 µM de cada primer, 1 µL de ADN molde, para un volumen final de 10 µL. Las condiciones de amplificación incluyeron un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min; seguido de 30 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación a 55°C por 30 s, extensión a 72°C por 45 s; y un paso de extensión final a 72°C por 5 min. Debido a la poca diferencia en el tamaño de los productos de amplificación de *tet(A)* y *tet(M)*, cualquier resultado dudoso fue confirmado repitiendo la prueba y utilizando los cebadores específicos de cada gen.

Tabla 10. Secuencia de cebadores para la detección de genes de resistencia a tetraciclina.

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Producto (bp)
<i>tet(A)</i>	tetA-F	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	210
	tetA-R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	
<i>tet(B)</i>	tetB-F	TTGGTTAGGGGCAAGTTTGT	659
	tetB-R	GTAATGGGCCAATAACACCG	
<i>tet(G)</i>	tetG-F	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	468
	tetG-R	AGCAACAGAATCGGGAACAC	
<i>tet(M)</i>	tetM-F	ACAGAAAGCTTATTATATAAC	171
	tetM-R	TGGCGTGTCTATGATGTTTCAC	

2.7. Diseño de la librería de aptámeros de ARN de secuencia aleatoria

Se diseñó una librería de aptámeros de ARN con longitud de cadena de 60 bases, conformada por: un extremo con secuencia fija de 17 bases (GUGCGUAAGAUAGUCGC), seguida por una secuencia aleatoria de aptámeros de 27 bases y el otro extremo con secuencia fija de 16 bases (GGGUCACAGGUUCGAA). Las secuencias de los extremos fueron diseñadas para la amplificación mediante RT-PCR de los aptámeros, para lo que se diseñaron los cebadores: aptSeq-F (5'-AAGTGCCTAAGATAGTCGC-3') y aptSeq-R (5'-GATTCGAACCTGTGACCC-3'). La librería de aptámeros y cebadores diseñados fueron obtenidos mediante síntesis química (Integrated DNA Technologies, www.idtdna.com).

2.8. Preparación de células electrocompetentes.

Para la preparación de células electrocompetentes de las cepas DH5 α , HST08 y BL21(DE3) de *E. coli* se siguió el protocolo que se describe a continuación:

Se inocularon 0.5 L de caldo LB con 2 % (v/v) de un cultivo O/N. Las células se cultivaron con agitación durante 2-3 horas a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 0.5-0.7. Seguidamente, se enfrió el cultivo en hielo (15 min aprox.) y las células se recuperaron por centrifugación (5000 rpm x 5 min). En adelante, los siguientes pasos fueron realizados a temperaturas cercanas a los 4°C. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet mediante resuspensión con solución fría de glicerol al 10% y se procedió a recuperar nuevamente las células mediante centrifugación. El paso anterior se repitió un mínimo de 3 veces para asegurar la eliminación de sales residuales que pudieran afectar la transformación. Las células lavadas, ya electrocompetentes, se resuspendieron en aproximadamente 3 mL de solución de glicerol fría al 10%, se dividieron en alícuotas de 100 μ l y se almacenaron a -80°C para su posterior transformación mediante electroporación.

2.9. Diseño de genes sintéticos

Utilizando bases de datos de genes (www.ncbi.nlm.nih.gov, www.rcsb.org, www.uniprot.org), se realizó la búsqueda de las secuencias codificantes para proteínas que confieran resistencia a antibióticos de acción ribosomal, con el fin de diseñar genes sintéticos. Se eligieron 4 genes que codifican para metiltransferasas del ARNr que confieren resistencia a las familias de los

aminoglucósidos (*armA*, *rmtB* y *npmA*) y macrólidos (*ermC*) (Genes de referencia en Anexo 2.1). Para el diseño de los genes sintéticos, la secuencia de cada gen fue flanqueada en el extremo 5' con un adaptador unido a la diana de restricción de NdeI (CA[^]TA_TG) y de forma similar, el extremo 3' del gen estaba unido a la diana de restricción de XhoI (C[^]TCGA_G) y un adaptador (Figura 6). Además, se seleccionaron cebadores específicos para la detección por PCR de estos genes. Los genes sintéticos fueron adquiridos comercialmente en forma de fragmentos (Twist Bioscience) y cebadores, como oligos de ADN (IDT).

El diseño contempló la optimización de secuencias e inserción de dianas de restricción para la síntesis y posterior clonaje en los vectores según se describe en los apartados siguientes. Un total de 4 genes fueron diseñados y, posteriormente, enviados para ser sintetizados en forma de fragmentos (Twist Bioscience, EE.UU.).



Figura 6. Esquema del diseño de genes sintéticos.

2.10. Clonaje de genes sintéticos para expresión de proteínas recombinantes

Se utilizó el vector de expresión pET28a(+) (Novagen) como plataforma de clonaje y expresión de proteínas recombinantes. Se diseñó el vector pET28a-NpmA al insertar el gen *npmA* entre los sitios NdeI y XhoI del vector pET28a(+) y se ordenó su síntesis (Twist Bioscience, EE. UU.). Este vector fue posteriormente utilizado para el clonaje del resto de los genes sintéticos mediante digestión y ligación entre los sitios de restricción NdeI y XhoI, de forma que la proteína recombinante resultante se encontraba fusionada a un tag de 6 histidinas en el extremo N-terminal.

2.11. Verificación del clonaje de genes.

Los vectores ligados fueron transformados en células de *E. coli* cepa HST08. Las células transformadas con el pET28 fueron esparcidas en agar LB suplementado con kanamicina y ampicilina, respectivamente, e incubadas a 37°C durante 16-18 horas para obtener colonias aisladas. Utilizando la técnica de PCR de colonia se corroboró la presencia de los genes insertados en el vector. Posteriormente, se inocularon colonias positivas en caldo LB y se incubó con agitación a 37°C durante 16-18 horas. Los cultivos saturados fueron utilizados para recuperar plásmido (Aurum™ Plasmid Mini Kit, BioRad). Además, los plásmidos fueron enviados a secuenciar por el método de Sanger (Psomagen, EE. UU.), para verificar que no se introdujeron mutaciones en la secuencia codificante del fragmento insertado en el plásmido.

2.12. Expresión de proteínas recombinantes.

Una vez verificados los constructos para expresión de proteínas, se procedió a transformar la cepa de *E. coli* BL21(DE3) con los vectores pET28-NpmA, pET28-RmtB, pET28-ArmA y pET28-ErmC. Las células transformadas se cultivaron en agar LB suplementado con

kanamicina (50 µg/mL) a 37°C durante 16-18 horas para obtener colonias aisladas. Se transfirió una colonia transformada a caldo LB con kanamicina y se incubó con agitación a 37°C durante 16-18 horas, con el fin de tener un preinóculo saturado. Posteriormente, con el fin de determinar las mejores condiciones de expresión para cada proteína, se optimizaron variables como tiempo y temperatura de incubación, DO_{600nm} y concentración necesaria de inductor, seguida del tiempo de inducción (Tabla 11).

Tabla 11. Condiciones ensayadas para la expresión de las proteínas recombinantes NpmA, RmtB, ArmA y ErmC.

Proteína	Variable	Condiciones ensayadas
NpmA	DO _{600nm}	0.5 y 0.6
	Temperatura	20°C, 25°C y 37°C
	Tiempo de inducción	0.5 h – 20 h
	Concentración de IPTG	0.3 mM, 0.4 mM y 1.0 mM
	Medio de cultivo	LB y medio de autoinducción (LB suplementado con 2.9 g/L de glucosa, 11.17 g/L de glicerol y 7.6 g/L de lactosa, pH=7.8)
RmtB	DO _{600nm}	0.6-0.7
	Temperatura	25°C y 37°C
	Tiempo de inducción	0.5 h – 2 h
	Concentración de IPTG	0.4 mM
ArmA	DO _{600nm}	0.6-0.7
	Temperatura	37°C
	Tiempo de inducción	2 h
	Concentración de IPTG	0.4 mM
ErmC	DO _{600nm}	0.6-0.7
	Temperatura	25°C
	Tiempo de inducción	2 h
	Concentración de IPTG	0.4 mM

Para el análisis de los niveles de sobreexpresión y solubilidad de las proteínas recombinantes, se tomaron alícuotas de cultivo, se recuperaron las células por centrifugación (>8000 rpm), se lisaron las células y se procedió a la determinación de sobreexpresión mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

2.13. Purificación de proteínas recombinantes

Se procedió a la producción a mayor escala de las proteínas recombinantes, utilizando 1-2 L de cultivo obtenido en las condiciones óptimas establecidas en el apartado anterior. Una vez finalizado el protocolo de crecimiento y sobreexpresión, las células se recuperaron mediante centrifugación a 4°C y el precipitado se resuspendió en tampón de lisis (tampón de la proteína con 0.5 mg/ml de lisozima). La composición de los tampones utilizados se indica en la Tabla 12. Se lisaron las células mediante sonicación y se centrifugó la muestra (10 000 rpm, 4°C) para obtener el sobrenadante conteniendo la fracción proteica soluble. El sobrenadante fue filtrado (0.22 µm) y posteriormente cargado en una columna de cromatografía para la

purificación de proteínas recombinantes por afinidad a tag de histidinas (5 mL HiTrap™ TALON® crude, GE Healthcare), utilizando un purificador AKTA (GE Healthcare). A continuación, se realizaron varios lavados con el tampón de la proteína conteniendo 5 mM de imidazol para eliminar proteínas sin afinidad a la columna y las proteínas recombinantes de interés se eluyeron utilizando el mismo tampón conteniendo imidazol entre 250 mM – 500 mM. Las fracciones que contenían la proteína de interés fueron concentradas (Amicon® Ultra-15ml 10kDa cut-off, Millipore) y se realizó un último paso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200 10/300, Cytiva). La concentración de las proteínas recombinantes purificadas se determinó por medida de absorbancia a 280 nm. La presencia y pureza de las proteínas en las fracciones se evaluó por SDS-PAGE.

Tabla 12. Composición de tampones utilizados para la purificación de las proteínas recombinantes NpmA, ArmA y RmtB.

Proteína	Tampón	Composición
NpmA	Tampón A	20 mM de Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM β -mercaptoetanol
ArmA y RmtB	Tampón B	10 mM de Tris pH 7.5, 100 mM de NaCl, 3 mM de β -mercaptoetanol

2.14. Detección de aptámeros de ARN con capacidad de unión a las proteínas diana mediante “Pull down” y amplificación

Se utilizó una modificación de la tecnología SELEX para seleccionar aptámeros con afinidad por las proteínas purificadas ArmA, NpmA y RmtB. La metodología usada fue la siguiente (resumen gráfico en la Figura 7):

Las perlas magnéticas (resina de afinidad de agarosa Ni-NTA, GoldBio) fueron inmovilizadas en un sistema magnético (MagneSphere®, Promega), se lavaron 3 veces utilizando agua libre de nucleasas y otras 3 veces con la solución tampón de la proteína diana.

Inmediatamente antes de su uso, los aptámeros de ARN de cadena aleatoria fueron calentados a 95°C por 5 minutos, enfriados a 4°C y se dejaron a temperatura ambiente.

Previo a las rondas de selección, se incubó 10 μ M de aptámeros con las perlas magnéticas de níquel durante 30 min a temperatura ambiente. Las perlas fueron inmovilizadas y se recuperó el sobrenadante. De esta forma, se eliminarían los aptámeros con afinidad por las perlas, dejando en el sobrenadante los aptámeros a utilizar durante la selección.

Para el primer ciclo de selección, el sobrenadante del paso anterior fue incubado con perlas limpias y 1 μ M de proteína durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, las proteínas fueron inmovilizadas y lavadas utilizando tampón A (NpmA) o B (ArmA y RmtB) para remover aptámeros con poca afinidad o no unidos a las dianas. Seguidamente, las proteínas fueron removidas del sistema magnético, se resuspendieron en tampón, se desnaturalizaron a 95°C por 5 min y se enfriaron a 4°C. Los aptámeros contenidos en este sobrenadante se

incubaron con proteína fresca unida a resina magnética, iniciando así el siguiente ciclo de selección.

Inicialmente, se ensayaron 3 ciclos de selección y, atendiendo al resultado, se decidió aumentar a 5 ciclos.

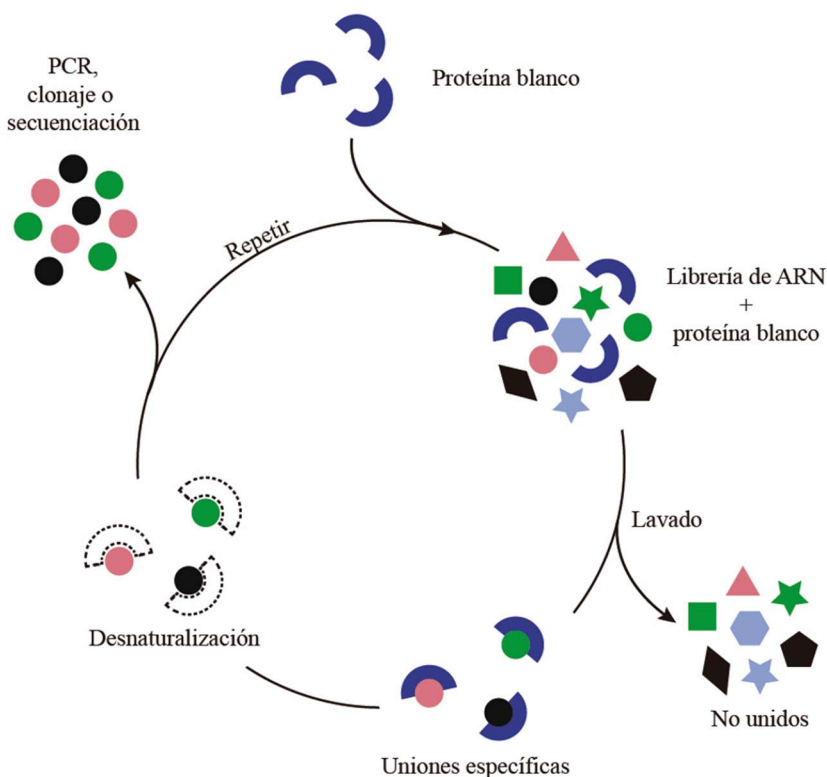


Figura 7. Esquema del método SELEX adaptado para la detección de aptámeros con afinidad a las proteínas recombinantes ArmA, RmtB y NpmA.

2.15. Identificación de aptámeros de ARN mediante clonaje y secuenciación

Los aptámeros de ARN obtenidos con el método SELEX fueron amplificados por RT-PCR para obtener aptámeros de ADN. Estos aptámeros fueron sometidos a una PCR consecutiva con el fin de aumentar el número de copias de cada aptámero. Los aptámeros obtenidos por PCR fueron purificados y ligados directamente en el vector pGEM-T (pGEM®-T Vector Systems) en proporciones 1:3 y 1:12. Además, se probaron 2 condiciones de incubación: 1 hora a temperatura ambiente u O/N a 4°C. Los productos de ligación fueron transformados en células electrocompetentes de *E. coli* DH5α que se sembraron en agar LB suplementado con ampicilina 100 µg/mL, IPTG 0.5 mM y X-Gal 80 µg/ml. Aquellas colonias que fueron transformadas con el vector religado (vector sin aptámeros insertados) presentaron una coloración azul después de ser crecidas durante 24 horas a 37°C seguidas de una incubación durante otras 24 horas a 4°C; mientras que, las colonias con inserto presentaron coloración

blanca. Estas últimas fueron sometidas a PCR de colonia para verificar la presencia de los aptámeros insertos.

Alternativamente, se utilizó el método de clonaje basado en PCR y digestión con enzimas de restricción, para lo que se amplificaron los aptámeros obtenidos por RT-PCR utilizando los cebadores aptCloning-F 5'-TAAGCAGAATTCAAGTGCCTAAGATAGTCGC-3' y aptCloning-R 5'-TGCTTACTGCAGGATTCTGAACCTGTGACCC-3', que permitían insertar los sitios de restricción (resaltados en negrita) EcoRI y PstI, respectivamente. Los productos de amplificación fueron purificados, sometidos a digestión doble (EcoRI y PstI, Promega) y ligados (utilizando T4 DNA Ligase y Rapid Ligation Buffer, Promega) en el vector pBSMrnaStrp entre los sitios EcoRI y PstI utilizando una proporción 1:12 (vector:inserto). Los productos de ligación fueron transformados en células de *E. coli* DH5 α y sembradas en agar LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL). Se verificó la presencia de los aptámeros mediante PCR.

Para ambos casos, las colonias positivas fueron crecidas en LB, se purificaron los plásmidos y se enviaron a secuenciar para identificar los aptámeros clonados.

2.16. Pruebas funcionales

Se utilizó el sistema de expresión de bajo número de copias pGDP, específicamente diseñado para ensayos de resistencia y desarrollo de adyuvantes para antibióticos (Cox et al., 2017). Los genes sintéticos fueron clonados entre los sitios NdeI y XhoI mediante digestión tanto del vector como del inserto y posterior ligación, utilizando una proporción 1:3 (vector: inserto). Se utilizaron las enzimas de restricción NdeI y XhoI (FastDigest, Thermo Scientific) para la digestión y Ligasa T4 (Promega) para la digestión.

2.16.1. Diseño del pARC y pARC2

Se evaluaron las principales características de los vectores de la serie pGDP y se eligieron algunas características para ser modificadas (Tabla 13).

Tabla 13. Principales características de los vectores utilizados, incluyendo el vector diseñado pARC/pARC2.

<i>Backbone</i>	Origen de replicación	Marcador de selección	Promotor
pGDP1	pBR322	KanR*	pBla
pGDP2	pBR322	KanR	pLac
pGDP3	pBR322	AmpR**	pBla
pGDP4	pBR322	AmpR	pLac
pARC	p15A	CmR***	pLac
pARC2	p15A	CmR	pBla

*KanR: confiere resistencia a kanamicina. **AmpR: confiere resistencia a ampicilina.

***CmR: confiere resistencia a cloranfenicol.

La creación del vector pARC-ArmA partió de la secuencia lineal del vector pGDP4-ArmA, cortando el vector en el sitio de restricción XhoI, completando la diana a cada extremo y

agregando adaptadores. Se reemplazó el fragmento que incluía el origen de replicación pBR322 ori, promotor, *cassette* de resistencia a ampicilina (AmpR) bom y rop, por un fragmento del pACYCDuet-1 que contenía el p15A (origen de replicación), promotor *cat* y *cassette* de resistencia a cloranfenicol (CmR). Luego, se modificó el sitio de reconocimiento de XbaI (T/CTAGA) del fragmento del pACYCDuet-1 por el sitio EcoRI (G/AATTC). Se ordenó la síntesis de este vector (TwistBioscience, U.S.) y, en el laboratorio, se utilizó XhoI para digerir los extremos y ligasa T4 para religar el vector (resumen gráfico en la Figura 8). El producto fue transformado en células electrocompetentes de *E. coli* cepa DH5 α . Las transformantes fueron sembradas en agar LB suplementado con cloranfenicol (34 μ g/mL) e incubadas *overnight*. Se transfirieron algunas colonias transformantes a caldo LB suplementado con cloranfenicol, se incubó *overnight* y se comprobó la funcionalidad del gen *armA* al inocular 2% de la cepa en caldo LB suplementado con kanamicina 200 μ g/mL. Además, se purificaron los plásmidos y se verificó el correcto religado del plásmido mediante restricción. Las colonias comprobadas fueron seleccionadas y criopreservadas.

Adicionalmente, el diseño del vector pARC permite el cambio de la secuencia del promotor mediante clonaje por restricción. Para esto, usando como referencia la secuencia entre EcoRI y XbaI, se reemplazó el promotor débil *lac* (pLac) por la secuencia del promotor fuerte *bla* (pBla) y se agregaron adaptadores en los extremos. Este fragmento fue enviado a sintetizar para su posterior clonaje en el vector. Sin embargo, no fue necesario su uso, debido a que la MIC expresada por el promotor débil ya era lo suficientemente alta y no se requirió el uso de la cepa expresando las proteínas con un promotor fuerte.

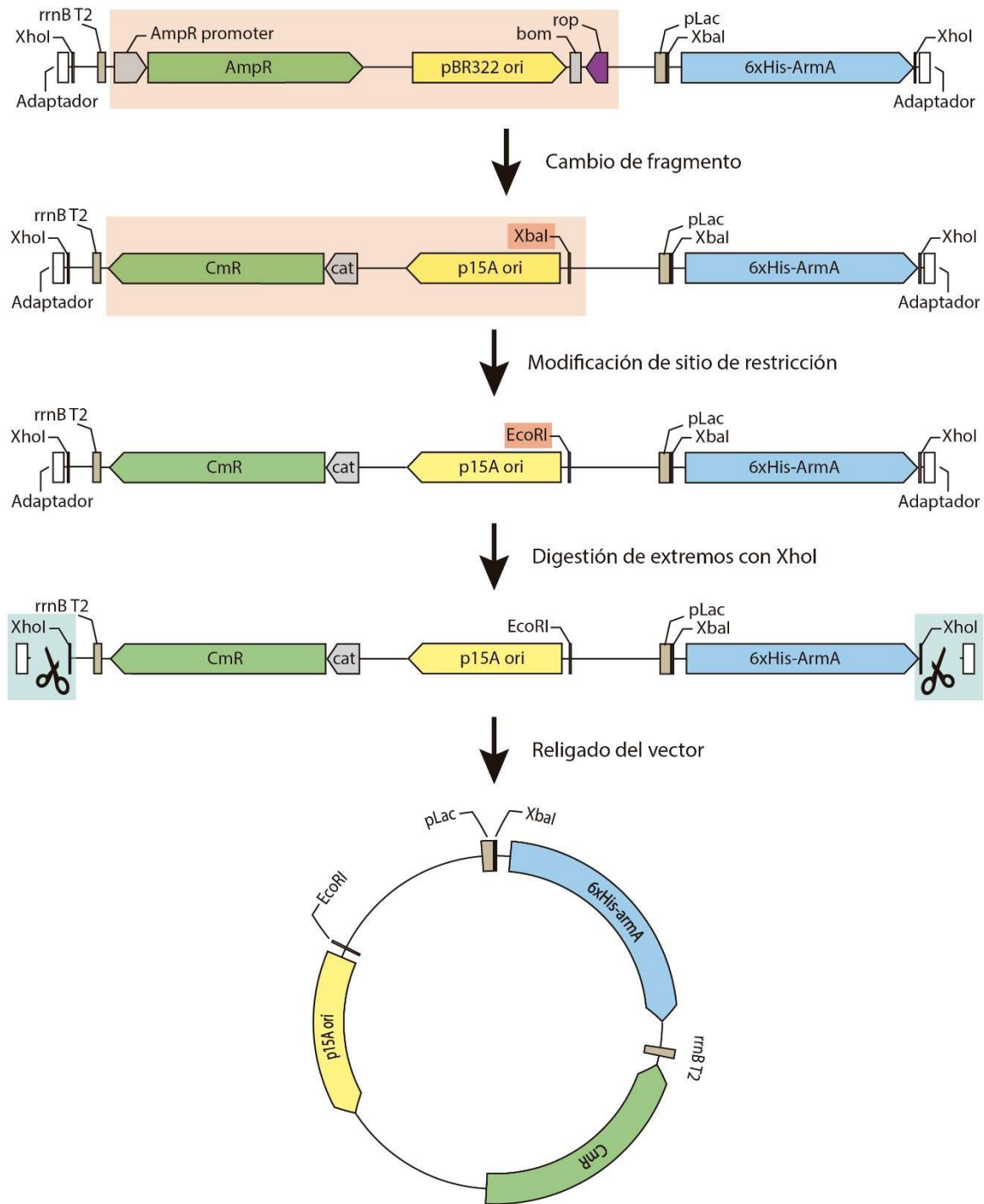


Figura 8. Diseño del vector pARC-ArmA.

2.17. Análisis de la interacción proteína-aptámero

Se cotransformaron, mediante electroporación, células de *E. coli* cepa BL21(DE3) con los vectores pET28a y pBSMrna para expresar simultáneamente las proteínas recombinantes y los aptámeros de ARN, respectivamente. Las células transformadas fueron sembradas en platos de agar LB suplementados con kanamicina (50 µg/ml) y ampicilina (100 µg/ml). También se obtuvo un control de expresión de proteínas al transformar las células con el vector pET28a y sembrar las células transformantes en platos de agar con kanamicina. Para obtener preinóculos, se transfirió una colonia de cada cepa a un tubo de caldo LB con los antibióticos respectivos y se incubaron en agitación a 37°C *overnight*. Se inocularon 30 ml de caldo LB (con kanamicina o kanamicina+ampicilina) con 2% (v/v) de los preinóculos, se crecieron hasta aproximadamente 1.0 OD_{600nm}. Se indujo la expresión de proteínas al agregar IPTG (0.05 mM – 1.0 mM) al medio de cultivo e incubar las células en agitación a 37°C durante 2 horas.

Para la purificación de las proteínas y complejos proteína-ARN, se recuperaron las células mediante centrifugación, se descartó el sobrenadante y los pellets fueron congelados a -80°C para facilitar la lisis. Posteriormente, se resuspendieron los pellets en 0.5 mL de tampón de purificación de la proteína diana y las células fueron lisadas mediante sonicación. El lisado fue clarificado mediante centrifugación (15 000 rpm x 15 min a 4°C) y el sobrenadante se incubó a temperatura ambiente con 100 µL de resina magnética de níquel-agarosa (GoldBio). La resina fue inmovilizada mediante sistema magnético, se lavó 3 veces con tampón de la proteína diana conteniendo 5 mM de imidazol y 10% de glicerol, y se eluyó con el mismo tampón conteniendo 250 mM de imidazol y 10% de glicerol. Se cuantificó la concentración de proteína y ácidos nucleicos de las muestras utilizando nanodrop.

Se utilizaron electroforesis en condiciones nativas para determinar la interacción entre las proteínas y los aptámeros de ARN. Para ello, se cargaron las muestras en geles nativos de poliacrilamida al 10% (Anexo 4) y se corrieron en el sistema de tampón Tris-glicina-EDTA pH 8.3 (Tris 27 mM, glicina 192 mM y EDTA 1 mM) a 12 mA (constante) durante aprox. 2 horas a 4°C. Los geles fueron teñidos con GelGreen™ 10X (GoldBio, U.S.) en tampón de corrida durante 30 min y los ácidos nucleicos fueron visualizados bajo luz UV en fotodocumentador. Posteriormente, se utilizó Azul de Coomassie para teñir las proteínas del gel, seguido de solución de decoloración para eliminar el color de fondo.

Se evaluó el efecto de la concentración de sal (NaCl) en la disociación de los ácidos nucleicos y aptámeros. Para esto, se indujeron las células con 0.4 mM de IPTG y se purificaron las proteínas y complejos proteína-ARN como se detalló anteriormente, pero con la siguiente modificación: las soluciones tampón utilizadas para la lisis, lavado y elución contenían 100 mM, 250 mM o 400 mM de NaCl. Los productos obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en condiciones nativas, según el protocolo descrito.

2.18. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados en el software R. Se realizaron análisis descriptivos para resumir y analizar los datos obtenidos en los ensayos de susceptibilidad y detección de genes de resistencia a los antibióticos. Se utilizó la prueba de rangos con signos de Wilcoxon ($\alpha=0.05$) para determinar diferencias entre la distribución de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de las cepas aisladas en cada sitio de muestreo. Además, se utilizaron las pruebas de Fisher y Chi-cuadrado para analizar la asociación entre los diferentes genes de resistencia y los valores de MIC obtenidos para tetraciclina y cloranfenicol.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Aislamiento de *E. coli*

Tras los inóculos en tubos con caldo lauril triptosa (Figura 9A) y caldo bilis verde brillante (Figura 9B), aislamiento de las colonias en agar EMB (Figura 9C) y confirmación de actividad GUR en caldo EC-MUG bajo luz ultravioleta (Figura 9D), se obtuvieron 120 colonias presuntivas de *E. coli* (60 por cada sitio de muestreo), de las que se seleccionaron 100 para este estudio (50 cepas por sitio de muestreo). Los aislados se criopreservaron a -20°C y -80°C, utilizando 40% y 20% de glicerol, respectivamente.

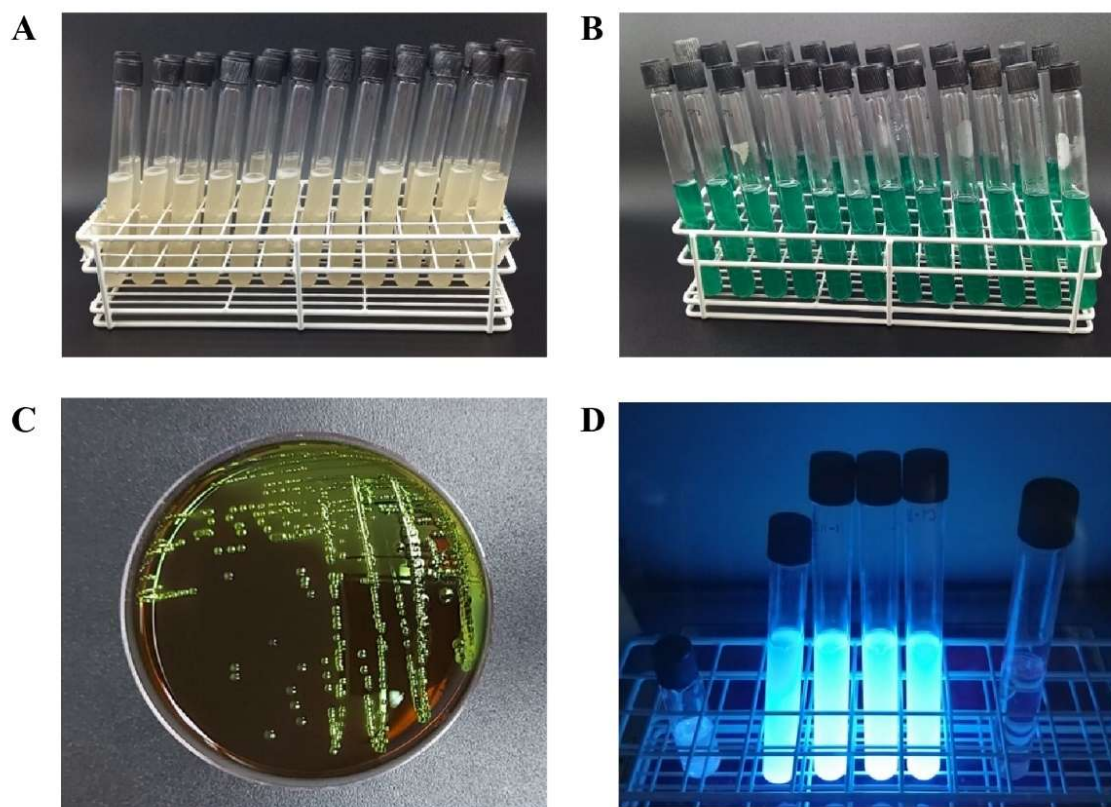


Figura 9. Detección de *E. coli* a partir de muestras de agua del río Juan Díaz y la PTAR de la Ciudad. (A) Tubos con caldo lauril triptosa con presencia de crecimiento y fermentación, (B) Tubos con caldo bilis verde brillante con presencia de crecimiento y fermentación, (C) Colonias presuntivas de *E. coli* en agar EMB y (D) Confirmación de actividad GUR en caldo EC-MUG por fluorescencia bajo luz ultravioleta.

3.2. Confirmación molecular de aislados de *E. coli*

Se verificó la temperatura de hibridación de los cebadores utilizados para amplificar los cuatro genes que permiten confirmar molecularmente que los aislados obtenidos mediante la metodología utilizada eran efectivamente *E. coli*, encontrándose que, todos los genes se amplificaban en el rango de 56.4°C – 58.8°C (Figura 10). Mediante estos ensayos se pudo

determinar que la temperatura óptima de hibridación para la PCR Multiplex de confirmación de los aislados era de 58°C.

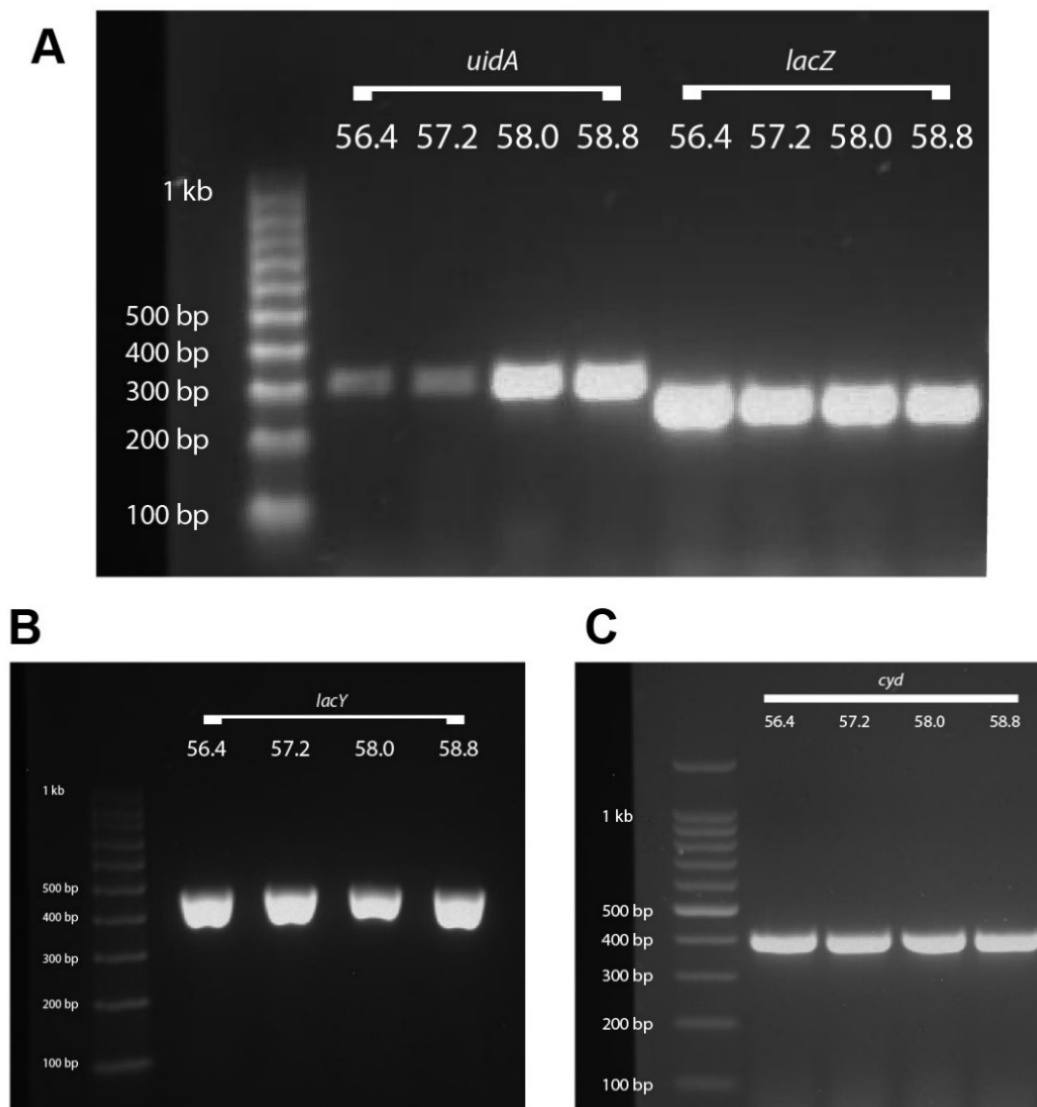


Figura 10. Verificación de la temperatura de hibridación de los genes para identificación molecular de *E. coli* (A) *uidA*, *lacZ*, (B) *lacY* y (C) *cyd*. Se muestran las amplificaciones para el gradiente en el rango de 56.4°C y 58.8°C.

Al incluir los cebadores para la PCR Multiplex, utilizando colonias como ADN molde, se logró amplificar los 4 genes en conjunto. Sin embargo, se observó que la amplificación del gen *lacY* era menos eficiente que la detectada para el resto de los genes. Por ello, se ajustó la concentración de todos los cebadores a 0.2 μ M (excepto los utilizados para la amplificación de *lacY*) con lo que se obtuvo una mejor amplificación de todas las bandas (Figura 11).

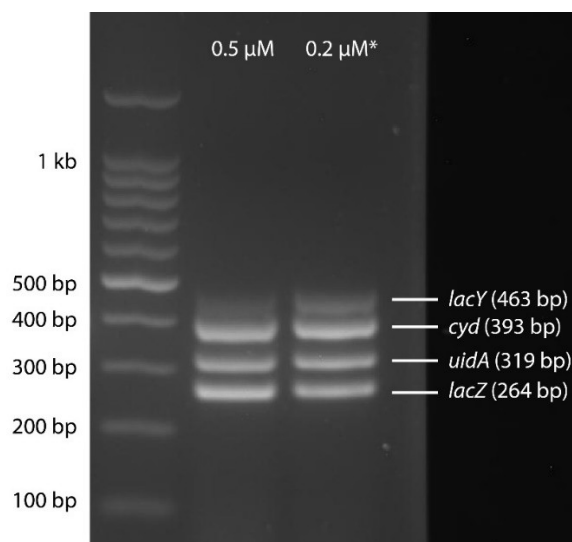


Figura 11. Resultados de PCR Multiplex de confirmación molecular de *E. coli* utilizando diferentes concentraciones de cebadores. Se observa la amplificación de los genes *lacY*, *cyd*, *uidA* y *lacZ* utilizando 0.5 μM de cada cebador (carril 1 de muestra) o 0.2 μM de los cebadores de todos los genes excepto *lacY* (carril 2 de muestra).

Previo identificación de los aislados, también se verificó si existía diferencia al utilizar ADN extraído mediante el método de hervido y la técnica de PCR de colonia. Se comprobó que no existía diferencia visible en el perfil de amplificación salvo una señal débil observada en los pocillos, producto de los restos celulares.

En resumen, las consideraciones para la PCR de confirmación molecular de *E. coli* fueron: (i) temperatura de hibridación de 58°C; (ii) la concentración de cebadores se ajustó a 0.2 μM a excepción de los que amplifican para *lacY*, que se mantuvieron en 0.5 μM ; (iii) uso de células como ADN molde (utilizando la técnica de PCR de colonia).

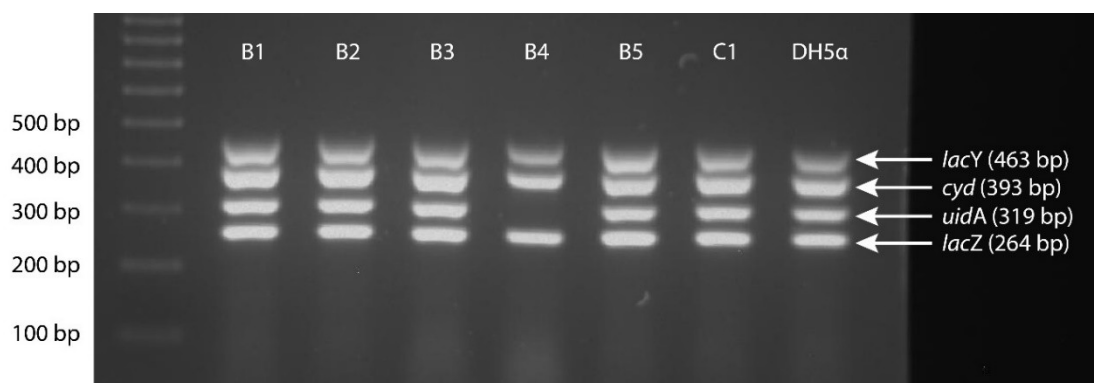


Figura 12. Confirmación molecular de cepas presuntivas de *E. coli* mediante la amplificación de los genes *lacY*, *cyd*, *uidA* y *lacZ*. Todas las cepas, excepto B4, amplificaron todos los genes, por lo tanto, son *E. coli*.

De las 100 cepas aisladas mediante el método convencional, un total de 99 cepas amplificaron correctamente los 4 genes objetivo y la colonia restante amplificó todos, excepto el gen *uidA*

(Figura 12). Aun así, dicha cepa se incluyó en los ensayos de susceptibilidad a los antibióticos que se presentan a continuación.

3.3. Ensayo de susceptibilidad a antibióticos dirigidos a ribosoma

A continuación, se realizaron los ensayos de susceptibilidad de los aislados de *E. coli* obtenidos mediante la técnica de microdilución descrita en la sección 2.4 de Metodología. Un total de 83 aislados, de los 100 seleccionados, presentaron resistencia a, al menos, uno de los antibióticos ensayados. De estos, 80 presentaban resistencia a, al menos, un aminoglucósido, 37 presentaban resistencia a tetraciclina y 19 a cloranfenicol (Figura 13A). Al comparar el número de cepas resistentes según el sitio de muestreo, no se encontraron diferencias significativas entre los aislados de la PTAR (Figura 13B) y los aislados del río (Figura 13C) (prueba de Wilcoxon, $p > 0.05$) y se mantuvo el mismo comportamiento; es decir, la mayor cantidad de aislados presentaba resistencia a los aminoglucósidos, seguidos de tetraciclina y cloranfenicol.

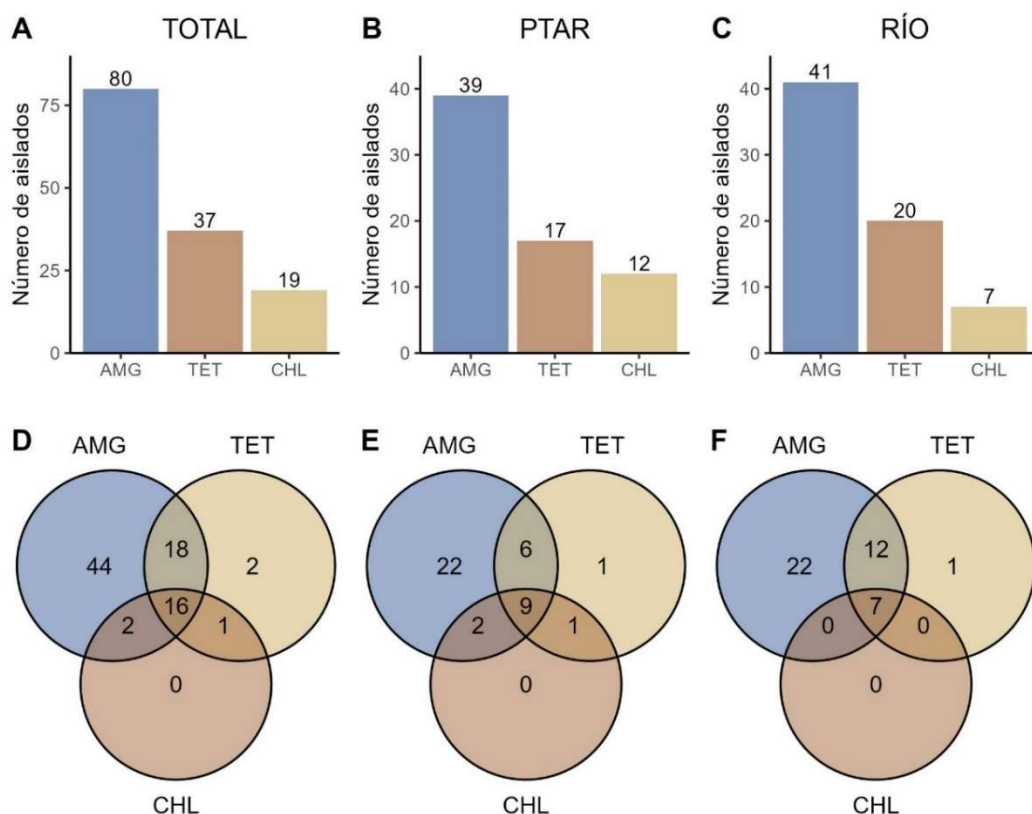


Figura 13. Perfiles de resistencia a los antibióticos de acción ribosomal de los aislados de *E. coli*. En azul se indican los aislados resistentes a aminoglucósidos, en marrón los resistentes a cloranfenicol y en crema los resistentes a tetraciclina (los números de aislados resistentes a cada antibiótico se especifican en la parte superior de cada barra, correspondiente a aislados totales (panel A), Planta de Tratamiento de aguas residuales (panel B) y río Juan Díaz (panel C). El número de resistencias y corresistencias, utilizando el mismo código de colores se muestra en ellos paneles D (aislados totales), E (Planta de Tratamiento de aguas residuales) y F (río Juan Díaz).

En general, los aislados resistentes a cloranfenicol y tetraciclina presentaban resistencia a más de una clase o multirresistencia (Figura 13D). No se encontraron aislados con resistencia única a cloranfenicol entre los aislados de la PTAR (Figura 13E) o del río (Figura 13F) y solo se identificó un aislado en cada sitio con resistencia única a tetraciclina. A diferencia de las otras 2 clases de antibióticos, si se encontró un gran número de cepas que solo presentaban resistencia a los aminoglucósidos y estaban distribuidos de forma similar en ambos sitios de muestreo.

Entre los aislados resistentes a los aminoglucósidos, se observó que el mayor número, tanto en el río como en la PTAR, presentan resistencia a gentamicina. Un número importante de aislados presentó resistencia a los antibióticos neomicina y estreptomicina. En cambio, el número de cepas resistentes a kanamicina o tobramicina fue relativamente bajo en comparación al del resto de antibióticos (Figura 14).

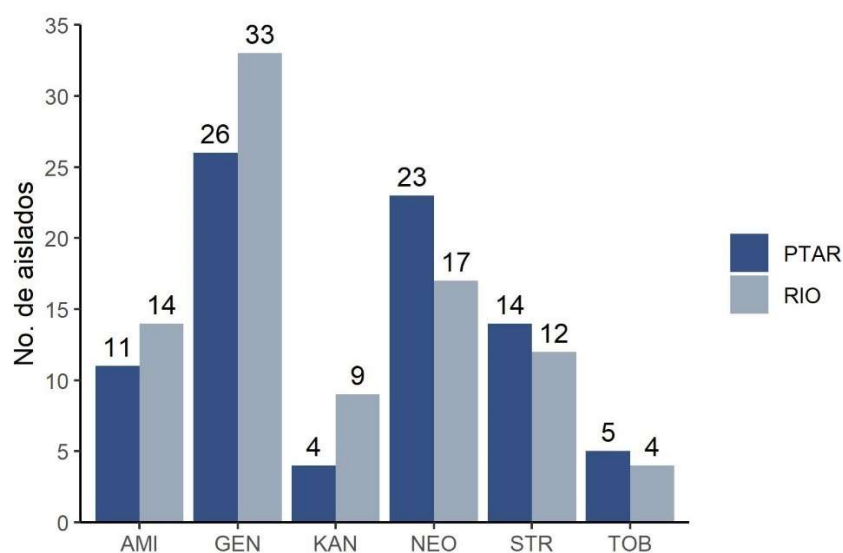


Figura 14. Perfiles de resistencia a los aminoglucósidos: AMI, amikacina; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; Neo, neomicina; STR, estreptomicina y TOB, tobramicina. Los aislados de la PTAR y del río son presentados como barras azul oscuro y azul claro, respectivamente. Los números en la parte superior de cada barra indican el número de aislados resistentes.

Al analizar los niveles de resistencia a los aminoglucósidos, se observó que, a pesar de que la mayoría de los aislados presentan resistencia a la gentamicina, éstos no presentaron altos niveles de resistencia (Figura 15 A y B); en contraste, la mayoría de los aislados resistentes a estreptomicina, presentaron altos niveles de resistencia (Figura 15 C y D). Los aislados resistentes a amikacina y tobramicina presentaron bajos niveles de resistencia (Figura 15 E – H); mientras que, los aislados resistentes a neomicina y kanamicina presentaron niveles de resistencias muy variables, y en algunos casos, presentaban MICs muy altas (Figura 15 I – L). Curiosamente, al comparar las distribuciones de MICs de cada aminoglucósido, por sitio de muestreo, no se observó diferencia significativa entre los aislados resistentes del río y PTAR (Prueba de Wilcoxon, $p > 0.05$).

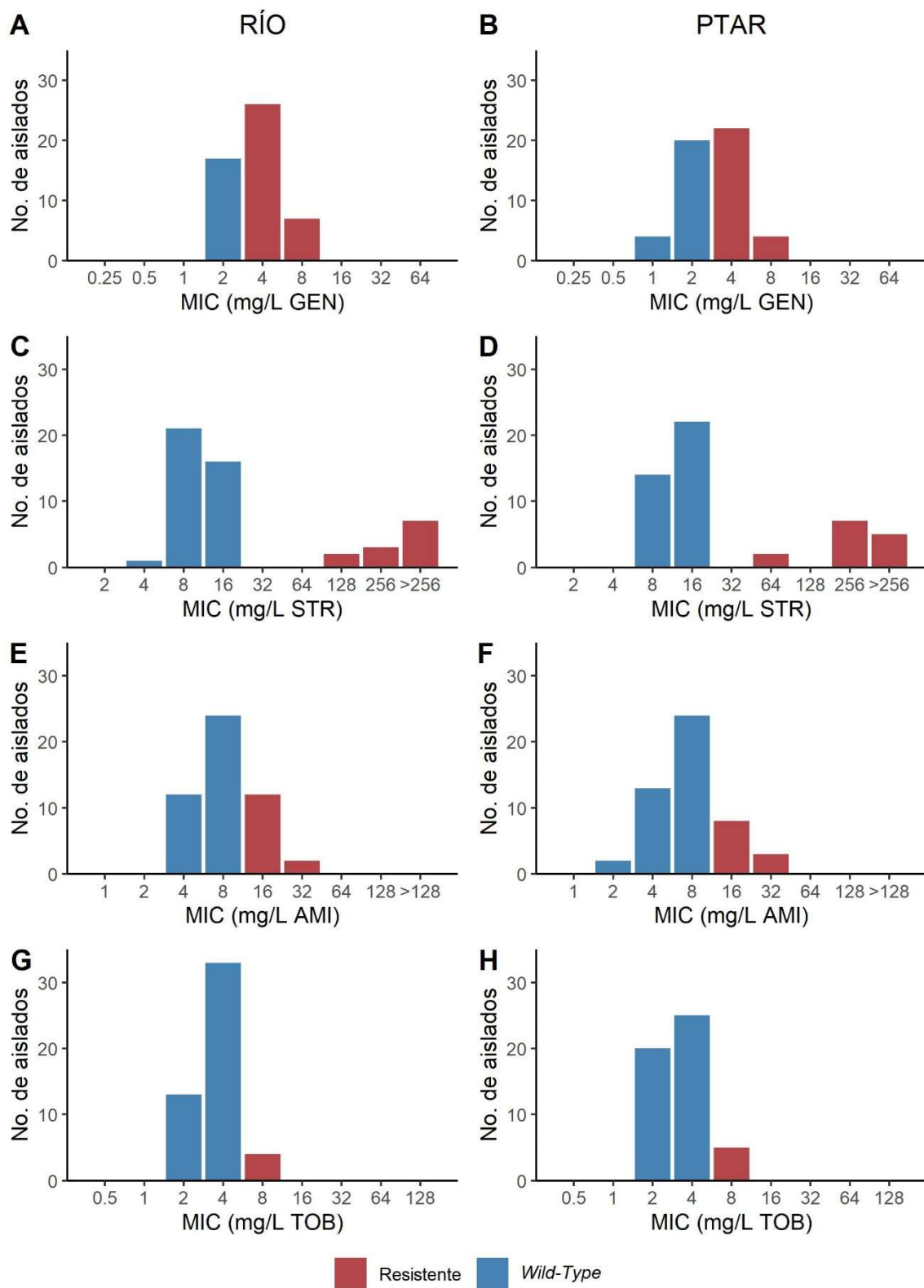
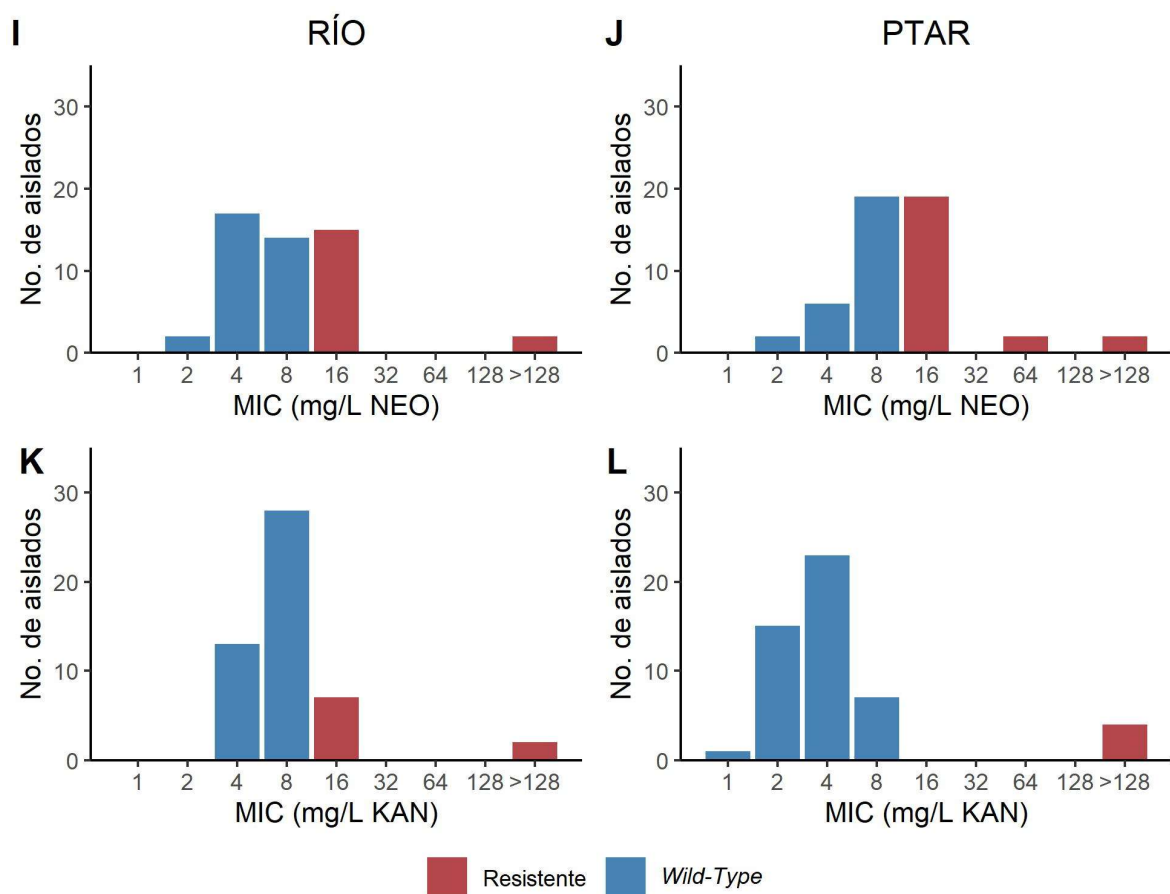


Figura 15. Distribución de MICs de los aminoglucósidos: GEN, gentamicina; STR, estreptomicina; AMI, amikacina y TOB, tobramicina. Los aislados resistentes y *wild-type* son representados en color rojo y azul, respectivamente.



Continuación de Figura 15. Distribución de MICs de los aminoglucósidos: NEO, neomicina y KAN, kanamicina. Los aislados resistentes y *wild-type* son representados en color rojo y azul, respectivamente.

Se encontraron 27 fenotipos diferentes de resistencia a los aminoglucósidos. El fenotipo más frecuente fue el de resistencia única a gentamicina, seguido por la resistencia conjunta a las diferentes combinaciones entre amikacina, gentamicina y neomicina. Solo 1 aislado presentó resistencia conjunta a todos los aminoglucósidos ensayados y no se encontraron aislados con resistencia única a kanamicina o tobramicina (Figura 16).

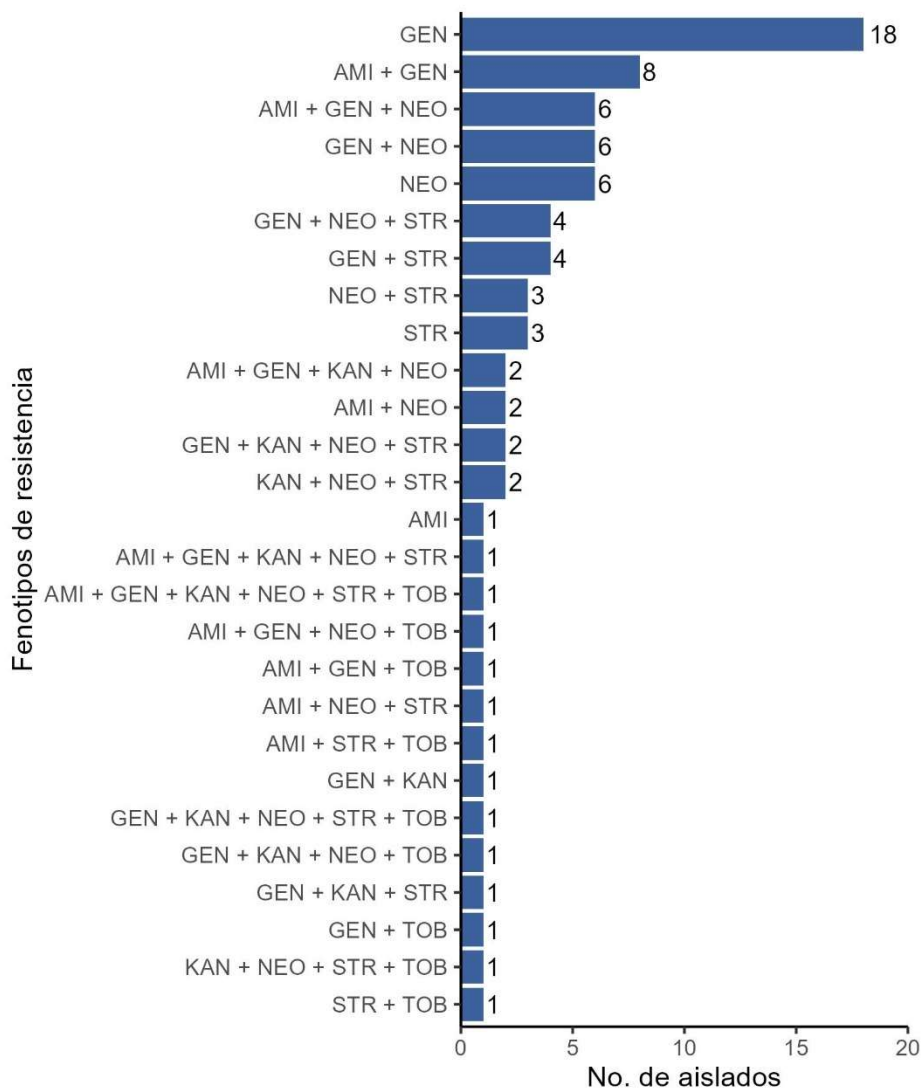


Figura 16. Fenotipos de resistencia a los aminoglucósidos: AMI, amikacina; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; Neo, neomicina; STR, estreptomicina y TOB, tobramicina. Los números a la derecha de la barra indican la frecuencia de cada fenotipo.

El número de aislados con resistencia conjunta disminuía a medida que aumentaba la cantidad de aminoglucósidos. Los fenotipos más frecuentes incluían resistencia a no más de 3 aminoglucósidos (Tabla 14).

Tabla 14. Resumen de aislados que presentaban fenotipos de resistencia conjunta a diferentes aminoglucósidos según los puntos de muestreo.

No. de aminoglucósidos	PTAR	Río	Total
1	14	14	28
2	12	14	26
3	10	6	16
4	1	6	7
5	1	1	2
6	1	0	1
Total	39	41	80

Los resultados de susceptibilidad a la tetraciclina demostraron que las cepas sensibles presentan MIC realmente bajas (≤ 1 mg/L), mientras que las cepas resistente presentaban un amplio rango de nivel de resistencia. Esta distribución de niveles de resistencias se observó tanto en la muestra del río como en la de la PTAR (Figura 17 A y B). En el caso del cloranfenicol, los resultados mostraron una gran variabilidad de MICs entre los aislados resistentes y los *wild-type* de ambos sitios de muestreo (Figura 17 C y D), sin superar la MIC de 256 mg/L de cloranfenicol. Al igual que en el caso de los aminoglucósidos, las distribuciones de las MICs tanto para la tetraciclina como el cloranfenicol tampoco fueron significativamente diferentes entre la muestra del río y la PTAR (Prueba de Wilcoxon, $p > 0.05$).

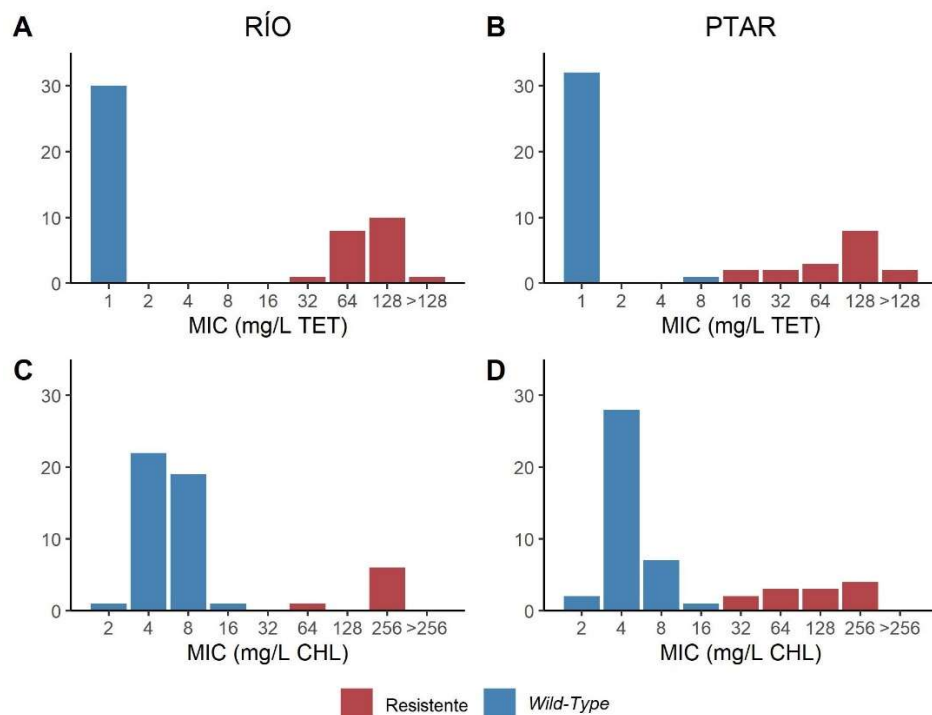


Figura 17. Distribución de MICs de tetraciclina (TET) y cloranfenicol (CHL). Los aislados resistentes y *wild-type* son representados en color rojo y azul, respectivamente.

En total, se encontraron 11 patrones de multirresistencia únicos entre las 16 cepas multirresistentes (Figura 18). En la muestra de la PTAR se encontraron 8 patrones únicos y en el río se encontraron 6 patrones únicos. En total, 5 patrones se repitieron entre los aislados (C1 y F3, E2 e I9, A3 y C10, J3 y A7, D7 y F6). La mayoría de los fenotipos de multirresistencia incluían los aminoglucósidos estreptomicina, gentamicina, neomicina o la combinación de éstos.

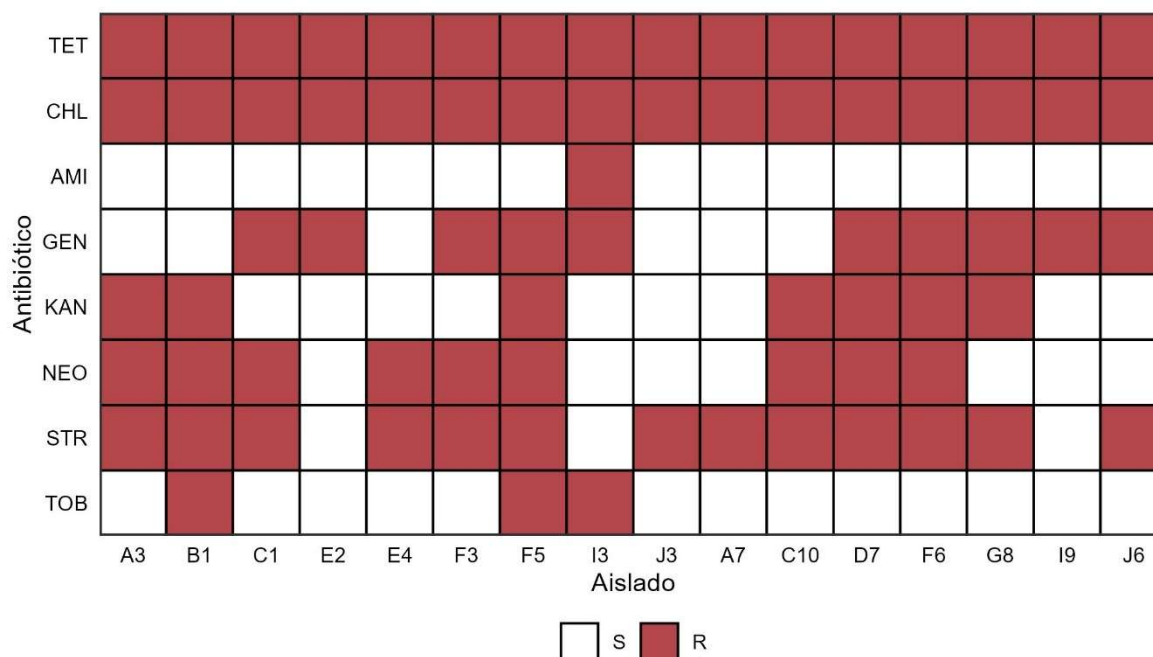


Figura 18. Patrones de multirresistencia de las cepas de *E. coli* aisladas de la PTAR (cepas A3 – J3) y del río Juan Díaz (cepas A7 – J6). En el eje de las ordenadas se presentan los antibióticos utilizados y en el eje de las ordenadas el nombre de las cepas resistentes. Las celdas en color rojo indican la resistencia al antibiótico.

3.4. Detección molecular de genes de resistencia

De los 83 aislados resistentes, se lograron detectar los probables genes de resistencia en el 52% de los aislados (43/83 aislados). Se detectaron un total de 10 genes de resistencia a las 3 clases de antibióticos: 5 genes de resistencia a los aminoglucósidos, 3 genes de resistencia a los anfenícolos y 2 genes de resistencia a tetraciclinas. Entre los aislados de la PTAR se lograron detectar estos 10 genes, mientras que, en el río, solo se observó amplificación para 8 genes (Tabla 15).

Tabla 15. Resumen de la frecuencia de los genes de resistencia a los antibióticos detectados en las cepas de *E. coli* aisladas de la PTAR y el río Juan Díaz.

Fenotipo	Gen	PTAR	Río	Total
AMG	<i>aac(3)-IIa</i>	1	1	2
	<i>ant(3'')-Ia</i>	7	8	15
	<i>aph(3'')-Ib</i>	11	6	17
	<i>aph(3')-Ia</i>	4	2	6
	<i>aph(6)-Id</i>	12	7	19
CHL	<i>CatA1</i>	3	0	3
	<i>cmlA</i>	4	5	9
	<i>floR</i>	8	6	14
TET	<i>tet(A)</i>	12	20	32
	<i>tet(B)</i>	9	0	9
Total		71	55	126

El gen de resistencia a tetraciclina más prevalente fue *tet(A)*, encontrándose en el 86.5% (32/37) de aislados resistentes a este antibiótico (Figura 19). Este fue el único gen de resistencia a la tetraciclina detectado en los aislados de *El coli* en el río. El gen *tet(B)* fue detectado en la mitad (9/18) de las *E. coli* resistentes a tetraciclina aisladas en la PTAR, en 4 ocasiones se detectaron juntos los genes *tet(A)* y *tet(B)*. Se detectó al menos un gen de resistencia para cada aislado resistente a tetraciclina. Los genes *tet(G)* y *tet(M)* no fueron detectados.

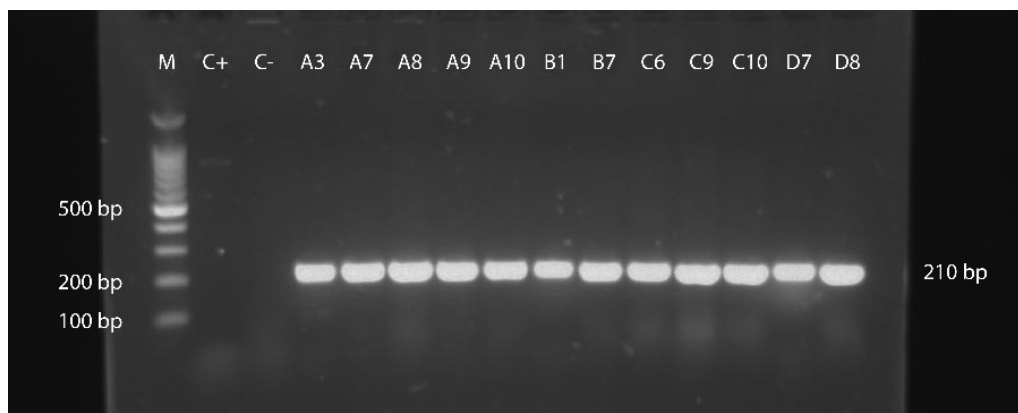


Figura 19. Resultados de la detección mediante PCR del gen de resistencia a tetraciclina *tet(A)*. En el gel se observan 12 aislados positivos para la presencia del gen *tet(A)*.

El gen *tet(A)* confirió diferentes niveles de resistencia entre los aislados, encontrándose aislados con MIC ≥ 32 mg/L. En cambio, los aislados portadores de *tet(B)*, presentaban MICs ≥ 128 mg/ml (Figura 20). A pesar de que, pareciera que *tet(B)* podría ser el responsable de los altos niveles de resistencia, no se encontró ninguna asociación entre los genes de tetraciclina encontrados y las MICs (Prueba de Chi-cuadrado, $p > 0.05$).

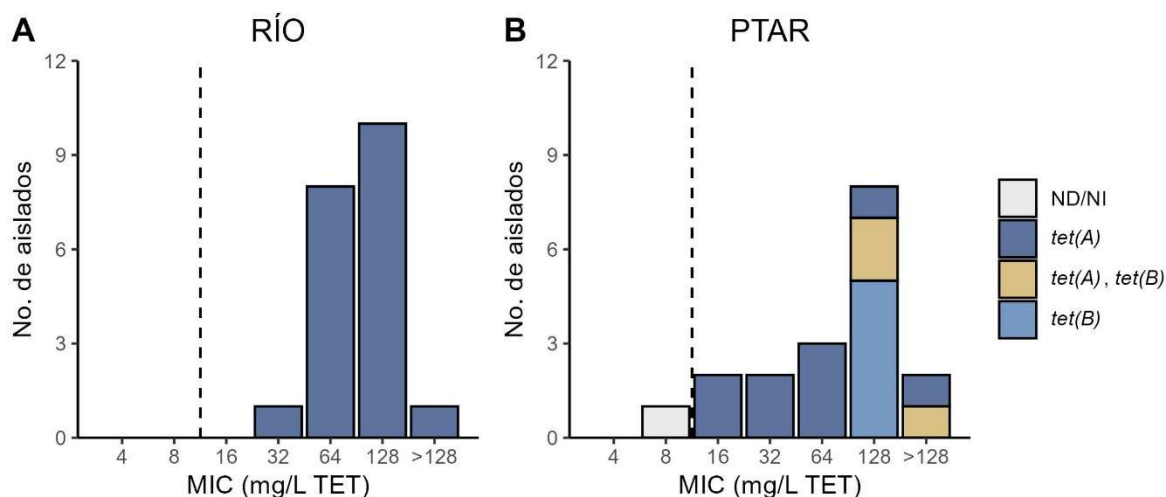


Figura 20. Distribución de genes de resistencia a tetraciclina, según la MIC de los aislados del (A) río Juan Díaz y (B) PTAR de la Ciudad. Los colores representan los genotipos de resistencia a tetraciclina encontrados.

El gen de resistencia a cloranfenicol más prevalente fue *floR*. Este gen se detectó en el 73.7% (14/19) de los aislados resistentes a cloranfenicol. Los genes del grupo *cmlA* también se detectaron en un gran número de cepas (47.3%) al igual que *floR*, que se detectó entre los aislados de ambos sitios de muestreo. Adicionalmente, se detectó el gen *CatA1* entre los aislados de la PTAR.

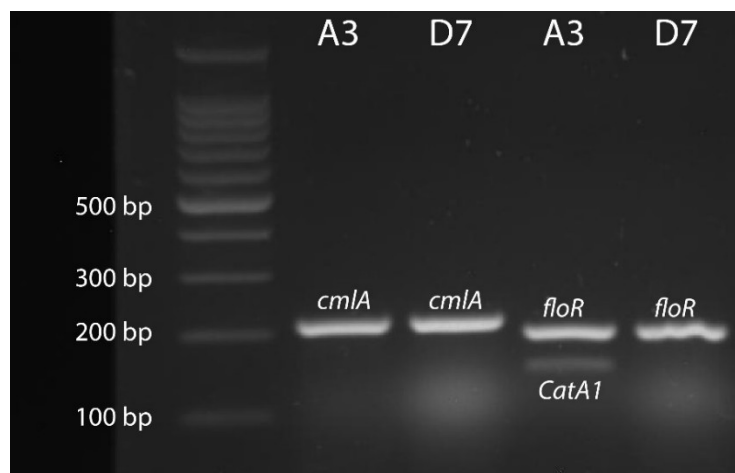


Figura 21. Genes de resistencia a cloranfenicol detectados en las cepas de *E. coli* A3 y D7, aisladas de la PTAR de la Ciudad y del río Juan Díaz, respectivamente.

Dentro del grupo de las 19 *E. coli* resistentes a cloranfenicol, se presentaron aislados con más de un gen de resistencia. La combinación más frecuente fue la de los genes *floR* y *cmlA* (8 aislados) y se detectó la presencia de los 3 genes *floR*, *cmlA* y *CatA1* en 1 sola cepa (Figura 21). No se pudo detectar ninguno de los genes diana de resistencia a cloranfenicol utilizados en este estudio en 2 cepas.

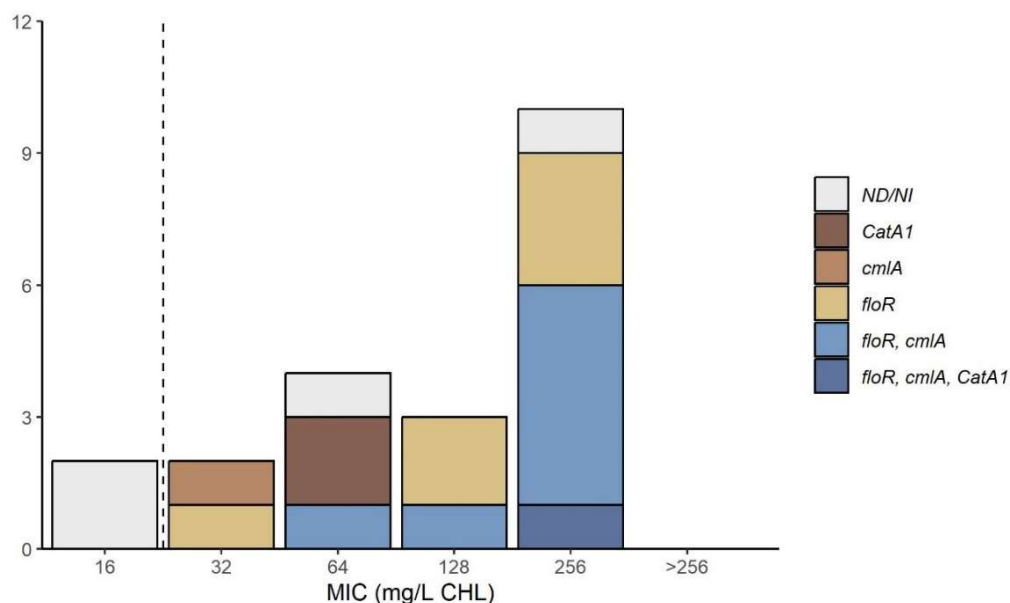


Figura 22. Distribución de genes de resistencia a cloranfenicol detectados, según la concentración mínima inhibitoria del aislado portador. Los colores representan los genotipos de resistencia a tetraciclina encontrados.

No se encontró asociación entre la distribución de genes de resistencia a cloranfenicol detectados y los niveles de resistencia (MIC) ensayados (Figura 22) (Prueba de Fisher, $p > 0.05$).

Se encontraron un total de 24 genotipos de resistencia únicos con los diferentes genes de resistencia detectados (Figura 23). El número máximo de genes detectados en un mismo aislado ascendió a 9, con una mediana de 3 antibióticos por cepa. Entre los genotipos, se repetía con frecuencia la combinación de un gen de resistencia a tetraciclina y 2 genes de resistencia a los aminoglucósidos. Al analizar la ocurrencia conjunta de algunos genes de resistencia, de acuerdo con su frecuencia de detección, se encontró:

- *aph(6)-Id* se detectó en todas las ocasiones que se detectaba *aph(3'')-Ib*.
- *tet(B)*, *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id* se detectaron juntos en los 3 los aislados portadores de *CatA1* identificados.
- *tet(A)* se detectó en todos los aislados portadores de *aph(3')-Ia*.
- *tet(A)* se detectó con frecuencia entre aislados portadores de *floR* (93%) y *cmlA* (89%).
- El gen *floR* usualmente era detectado junto a *cmlA* (89%).
- *ant(3'')-Ia* se detectó con frecuencia entre aislados portadores de *cmlA* (89%) y *aph(3')-Ia* (83%).

- Los genes de resistencia a cloranfenicol *floR* y *cmlA* se detectaron con la misma frecuencia en aislados portadores de *aph(3')-Ia* (83%).
- El gen *aac(3)-II*, al ser detectado en 2 aislados únicamente, no presentó mayor ocurrencia con otros genes.

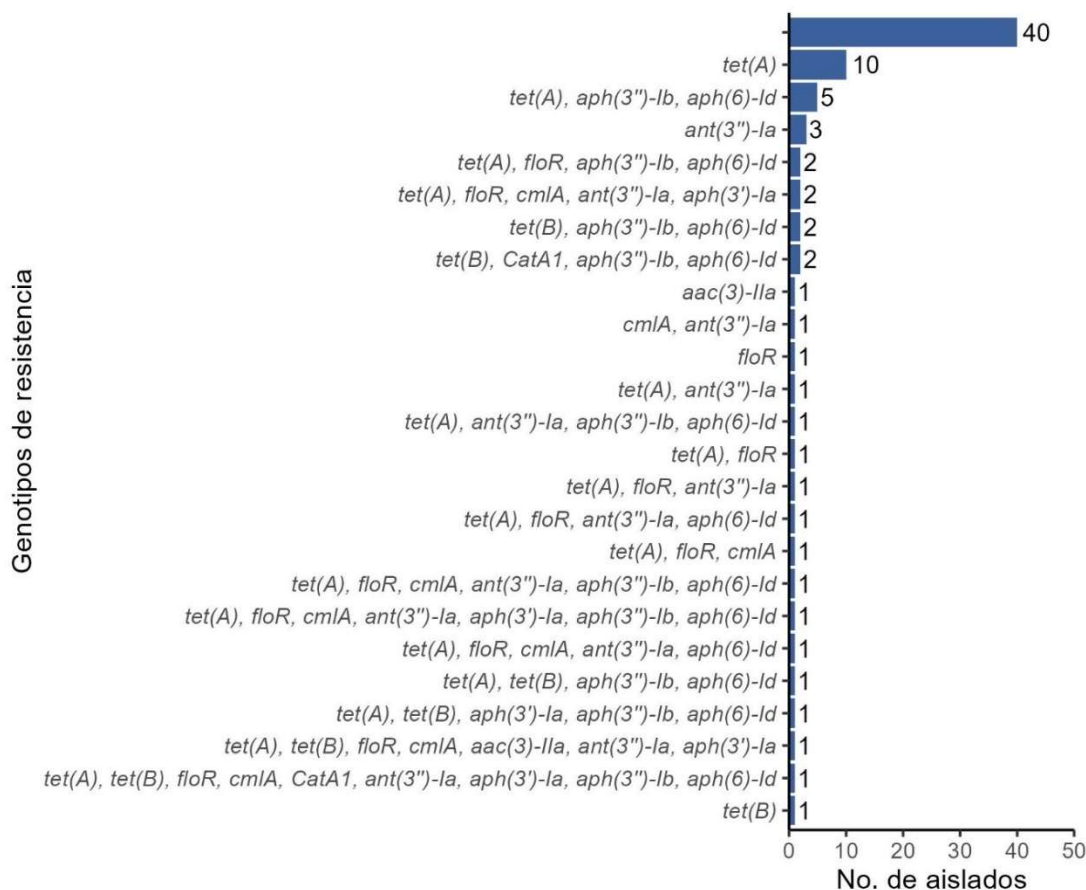


Figura 23. Genotipos de resistencia detectados entre los aislados resistentes de *E. coli*. Los números a la derecha de la barra indican la frecuencia de cada genotipo de resistencia.

A pesar de la gran variedad de genotipos encontrados, no se detectaron los genes de resistencia de 40 cepas resistentes. Adicional, en algunas cepas no se logró identificar los genes de resistencia de 1 o 2 clases más de antibióticos a las que eran resistentes. Así, se desconocen los genes de 51 cepas resistentes a los aminoglucósidos, la mayoría resistentes a gentamicina (Anexo 2.2). y corresistentes a tetraciclina; y, de 2 cepas resistentes a cloranfenicol.

Debido a que no se encontró un valor de corte epidemiológico de la eritromicina para *E. coli*, todos los aislados se clasificaron como *wild-type*. Sin embargo, se observó que todas las cepas presentaban MIC ≥ 32 mg/L, llegando a concentraciones tan altas como 1024 mg/L (Figura 24). Al igual que todos los demás antibióticos, la distribución de las MIC entre los sitios no fue significativamente diferente (Prueba de Wilcoxon, $p > 0.05$).

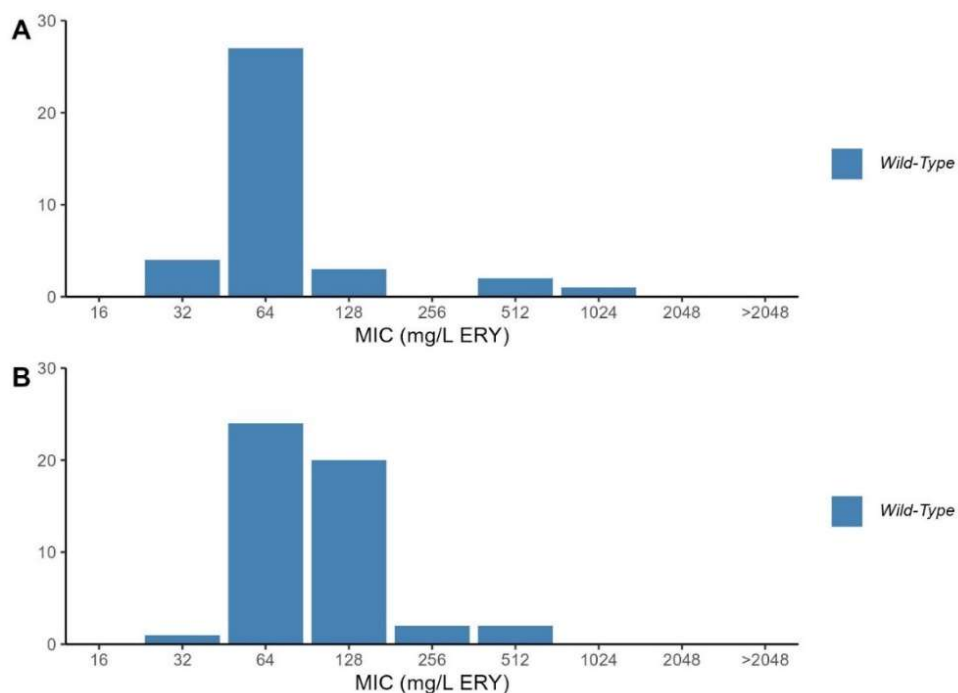


Figura 24. Distribución de MICs de la eritromicina para cepas de *E. coli* aisladas de (A) el río Juan Díaz y (B) la PTAR de la Ciudad. Todas las cepas fueron clasificadas como *wild-type*.

3.5. Clonaje de genes sintéticos para expresión de proteínas recombinantes

Los genes *armA*, *rmtB* y *ermC* fueron clonados exitosamente en el vector pET28, entre los sitios NdeI y XhoI, para la expresión de proteínas recombinantes fusionadas a un tag de 6 histidinas en el extremo N-terminal. Los constructos se verificaron por PCR de colonia, y se obtuvieron colonias con cada uno de los genes insertados en el vector (Figura 25 y Figura 26). Los constructos resultantes fueron enviados a secuenciar y se confirmó la correcta inserción de los genes.

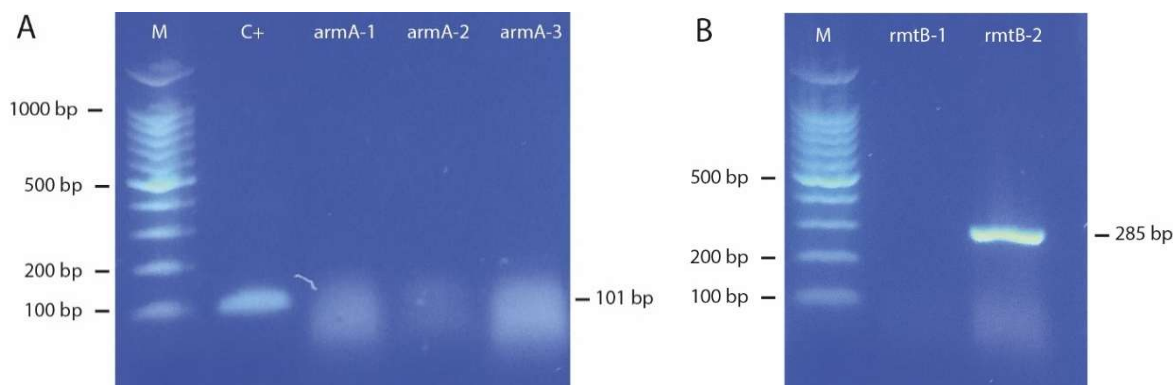


Figura 25. Resultado de la verificación del clonaje de pET28a-ArmA y pET28a-RmtB mediante PCR de colonia. Todas las colonias de *armA* (A) y la colonia *rmtB*-2 (B) fueron positivas para los vectores pET28a-ArmA y pET28a-RmtB, respectivamente.

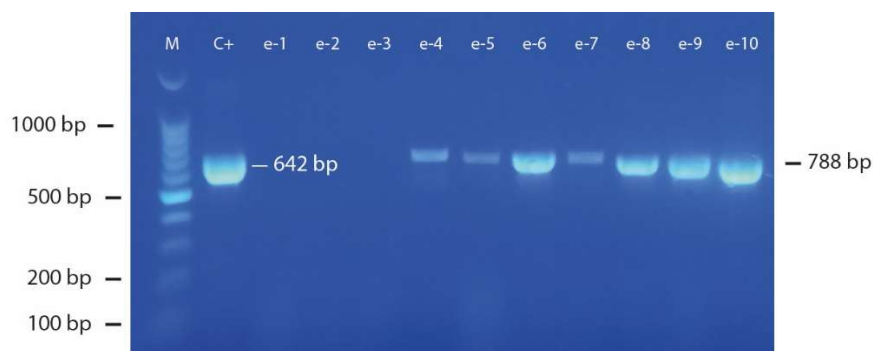


Figura 26. Verificación de clonaje de pET28a-ErmC mediante PCR de colonia. Las colonias e-4 a e-10 fueron positivas para el vector pET28a-ErmC.

3.6. Expresión de proteínas bajo diferentes condiciones

Todos los ensayos de expresión de proteínas recombinantes se realizaron utilizando colonias frescas de *E. coli* cepa BL21(DE3) transformadas con los vectores pET28 clonados (Figura 27).

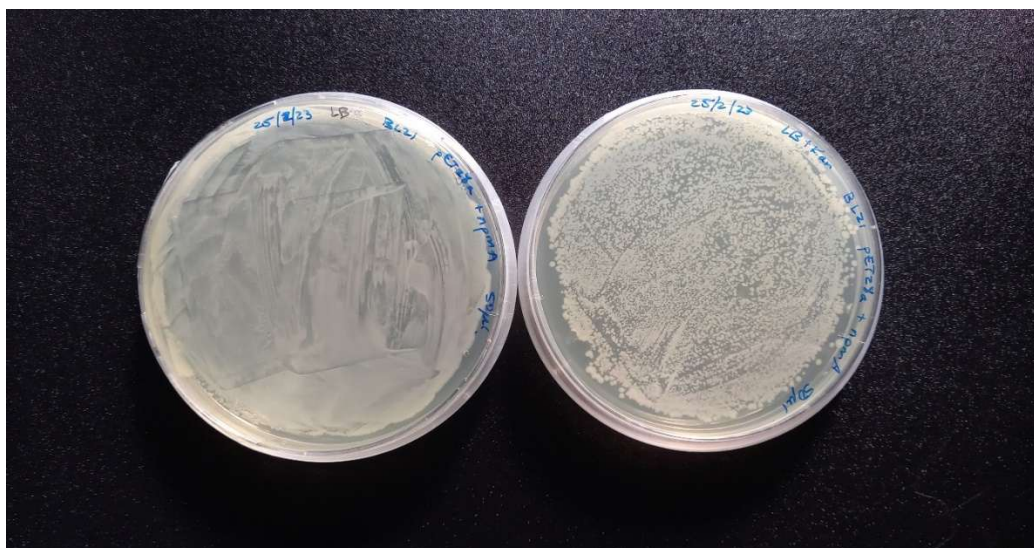


Figura 27. Transformación de células electrocompetentes de *E. coli* cepa BL21(DE3) con vector pET28a-NpmA. A la izquierda control en agar LB y a la derecha bacterias transformadas esparcidas en LB suplementado con kanamicina.

a. NpmA

Los primeros ensayos de inducción de NpmA se realizaron en cultivos con densidad óptica a 600 nm (OD_{600nm}) de 0.6 y en incubación a 37°C. Se indujo la expresión con concentraciones de 0.4 mM y 1.0 mM de IPTG. Para cada concentración de inductor, se tomaron alícuotas del cultivo (1 ml) después de 0.5 h, 1 h, 2 h y 3 h de haber sido inducido. Mediante SDS-

PAGE se determinó que la expresión de proteínas fue muy baja en las condiciones ensayadas (Figura 28).

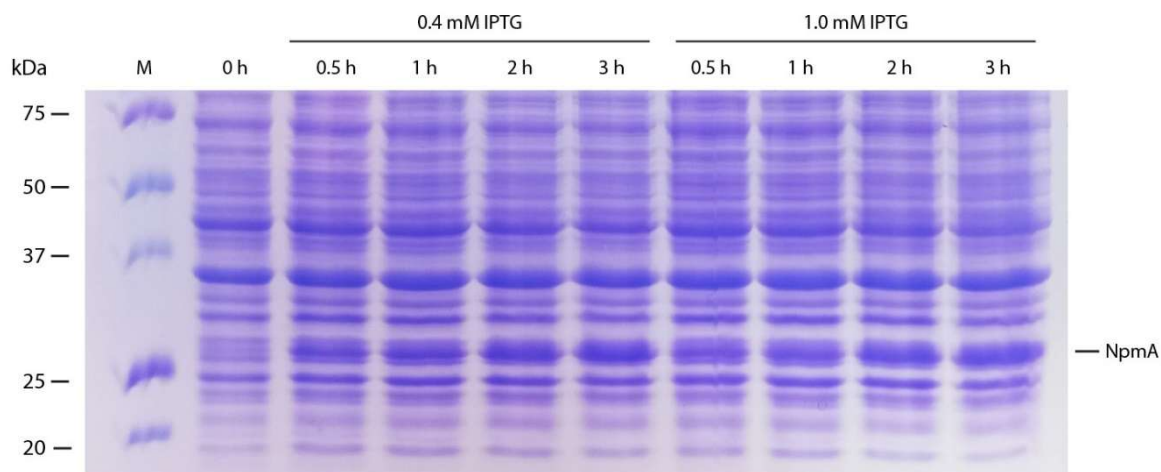


Figura 28. Expresión de NpmA a 37°C utilizando diferentes concentraciones de IPTG durante diferentes tiempos de incubación.

Posteriormente, se ensayó la inducción a 25°C en cultivos con OD_{600nm} de 0.6, utilizando 0.4 mM de IPTG o utilizando medio de autoinducción (LB suplementado con 2.9 g/L de glucosa, 11.17 g/L de glicerol y 7.6 g/L de lactosa, pH=7.8). La autoinducción no funcionó, sin embargo, la inducción de la expresión de la proteína a esta temperatura fue superior a la observada a 37°C utilizando la misma concentración de IPTG. Además, se observó que la fracción soluble de NpmA era aparentemente mayor a la insoluble (Figura 29).

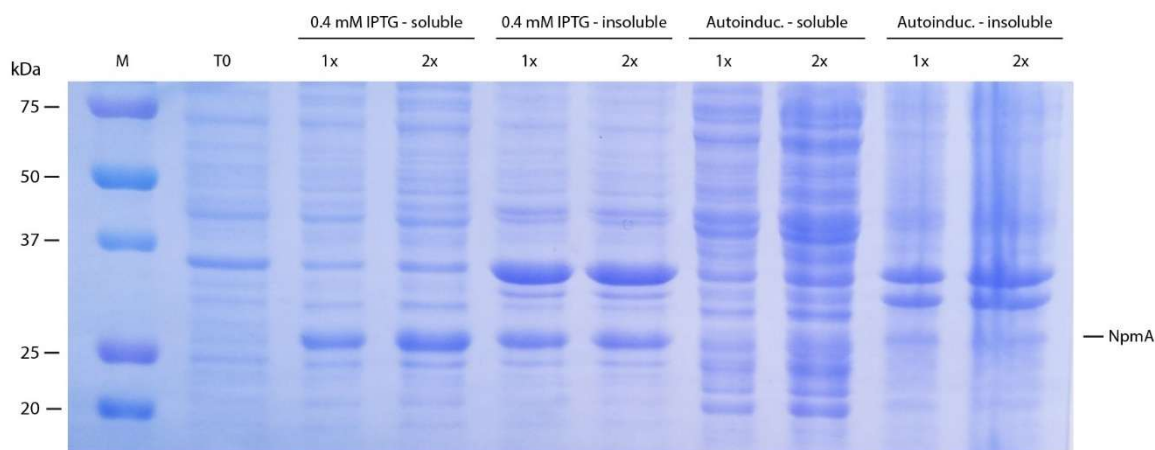


Figura 29. Expresión de NpmA a 25°C utilizando IPTG o medio de autoinducción.

Finalmente, se verificó la expresión a 20°C. Para esto, se creció el cultivo a 37°C hasta alcanzar una OD_{600nm} aproximada de 0.5, se atemperó el cultivo a 20°C y se indujo la expresión de la proteína utilizando IPTG a una concentración de 0.3 mM. Se incubó *overnight* (16 – 20 horas) y se lisaron las células para obtener la fracción soluble. La expresión a 20°C fue mejor que la observada a 25°C (Figura 30).

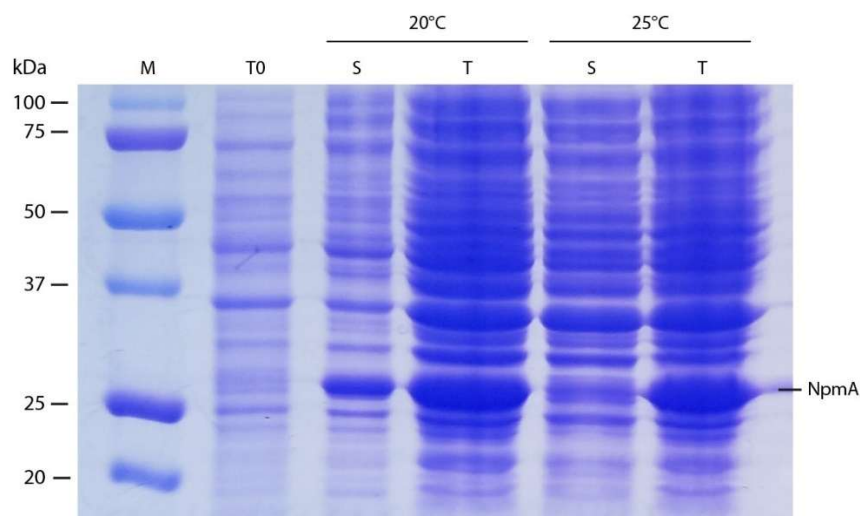


Figura 30. Expresión de NpmA a diferentes temperaturas. En el gel: (M) marcador, (T0) tiempo inicial, (S) fracción soluble y (T) proteínas totales.

b. RmtB

El ensayo de inducción de RmtB se realizó a partir de cultivos con OD_{600nm} entre 0.6-0.7. Se ensayó la inducción con 0.4 mM de IPTG a 37°C y 25°C, analizando la expresión a diferentes tiempos (0 h, 0.5 h y 2 h). Según los resultados visualizados por SDS-PAGE se observó que la expresión a 37°C obtuvo los mejores resultados (Figura 31).

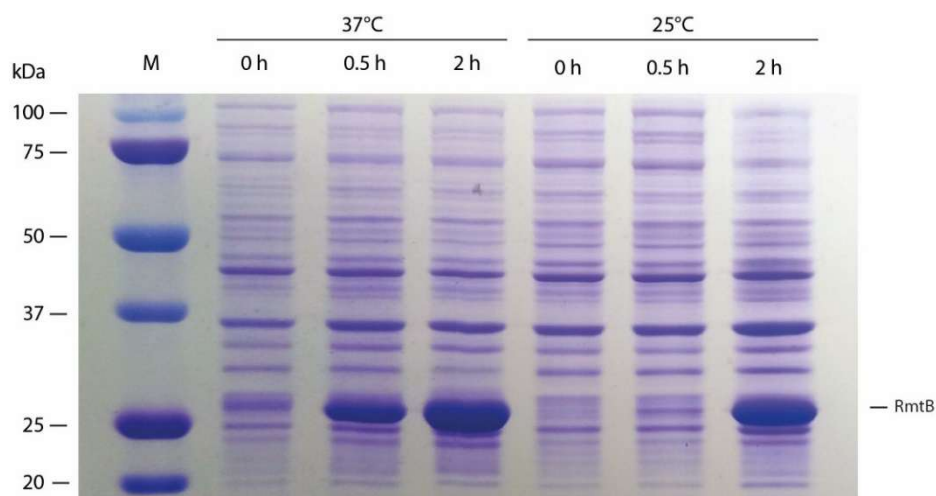


Figura 31. Expresión de RmtB a diferentes temperaturas y tiempos de inducción utilizando 0.4 mM de IPTG.

Se repitió la inducción con las mismas condiciones anteriores, pero con el fin de verificar la solubilidad de las proteínas. Para esto, las células en inducción se incubaron por 2 horas, se recuperaron por centrifugación y se lisaron mediante sonicación. Se separaron las fracciones solubles e insolubles y se verificaron por SDS-PAGE. Se observó que a 37°C la cantidad de proteína soluble era superior a la expresada a 25°C para el tiempo de incubación ensayado y suficiente para los ensayos de purificación (Figura 32).

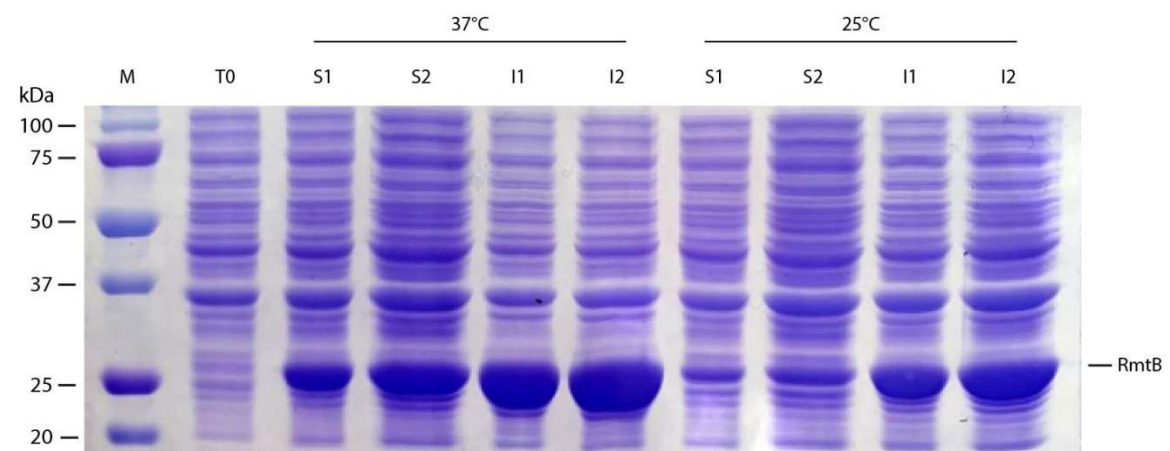


Figura 32. Diferentes temperaturas de expresión de RmtB. En el gel: (M) marcador, (T0) células antes de la inducción, (S1) fracción soluble, (I1) fracción insoluble. (S2) e (I2) contienen el doble de proteína que S1 e I1, respectivamente.

c. ArmA

Se ensayó la inducción de la expresión de ArmA de cultivos con OD_{600nm} entre 0.6-0.7, a 37°C con 0.4 mM de IPTG durante 2 horas. Luego de la inducción, las células se recuperaron por centrifugación, se descartó el sobrenadante y los pellets fueron (i) resuspendidos y las células se lisaron inmediatamente para separar las fracciones solubles e insolubles o (ii) congelados durante O/N, para luego ser resuspendidos, lisados y separar las fracciones. Al comparar las fracciones congeladas y no congeladas, no se observó diferencia notable entre los tratamientos y la cantidad de proteína expresada era suficiente para los ensayos de purificación (Figura 33).

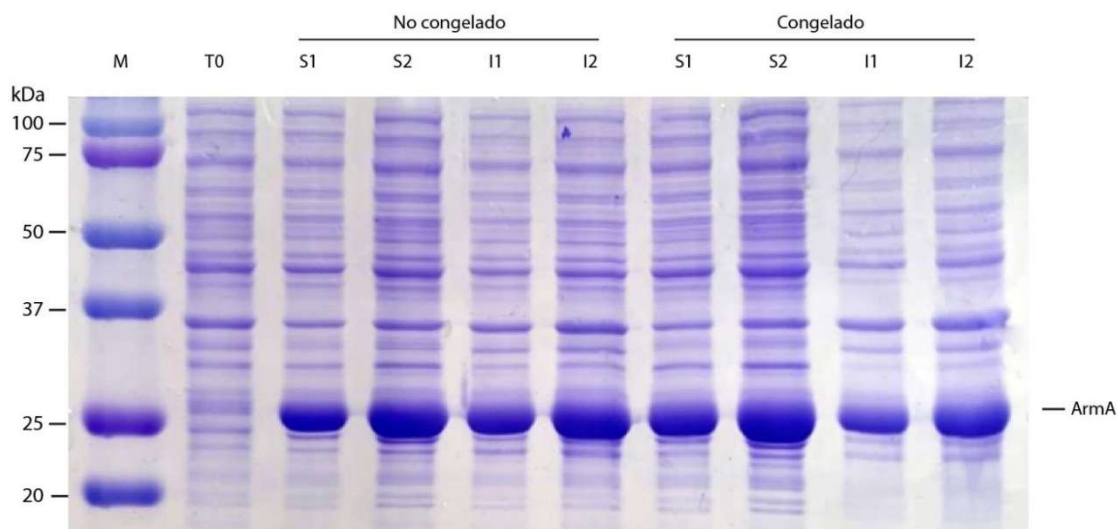


Figura 33. Influencia de la congelación en la solubilidad de ArmA. En el gel: (M) marcador, (T0) células antes de la inducción, (S1) fracción soluble, (I1) fracción insoluble. (S2) y (I2) representan el doble de S1 e I1, respectivamente.

d. ErmC

Para esta proteína, se ensayaron diferentes transformantes que contenían el vector. Se indujo un cultivo (OD_{600nm} entre 0.6-0.7) con 0.4 mM de IPTG y se incubó a 25°C durante 2 horas. Según los resultados, todas las transformantes expresaban la proteína al mismo nivel (Figura 34).

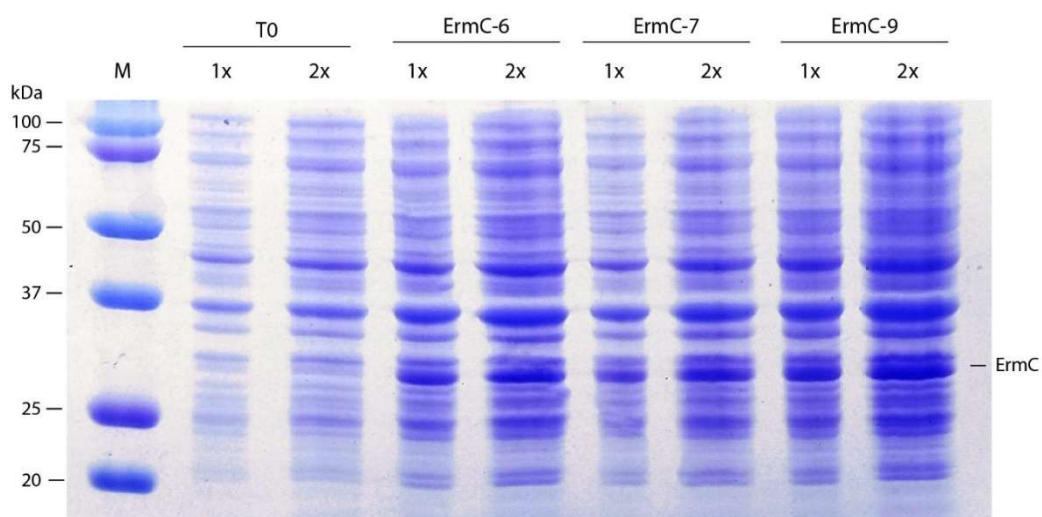


Figura 34. Verificación de expresión a 25°C de diferentes colonias (ErmC-6, ErmC-7 y ErmC-9) transformadas con el producto de ligación de pET28a-ermC. La cantidad de proteína cargada en el gel está representada por 1x o 2x, siendo 2x el doble de proteína 1x.

3.7. Purificación de proteínas

Utilizando métodos de cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión molecular se lograron purificar 3 de las 4 proteínas objetivo, para su posterior uso en la selección de aptámeros afines a cada una, mediante el método SELEX. Durante la cromatografía de afinidad se logró obtener las proteínas purificadas mediante gradientes lineales de 10 a 500 mM de imidazol, utilizando columnas de afinidad con cobalto inmovilizado. El método de exclusión molecular se utilizó para aumentar la pureza de las proteínas.

a. NpmA

NpmA fue eluido usando un gradiente lineal de 10 a 500 mM en tampón A. El pico máximo de la proteína se registró a una concentración de imidazol de aprox. 140 mM (Figura 35A). Las fracciones de proteína del segundo pico del cromatograma fueron analizadas por SDS-PAGE y se observó que contenían la proteína (Figura 35B). Estas fracciones se concentraron y se sometieron a una segunda purificación por cromatografía de exclusión molecular, donde, comparando el volumen de elución (Figura 35C) de la muestra con el patrón (Figura 35D), se comprobó que el peso molecular estimado según el volumen de elución observado correspondía a la proteína NpmA. Mediante SDS-PAGE se pudo verificar que la muestra se encontraba limpia de contaminantes y sin agregados. La proteína se almacenó a -20°C con 40% de glicerol para posteriores ensayos.

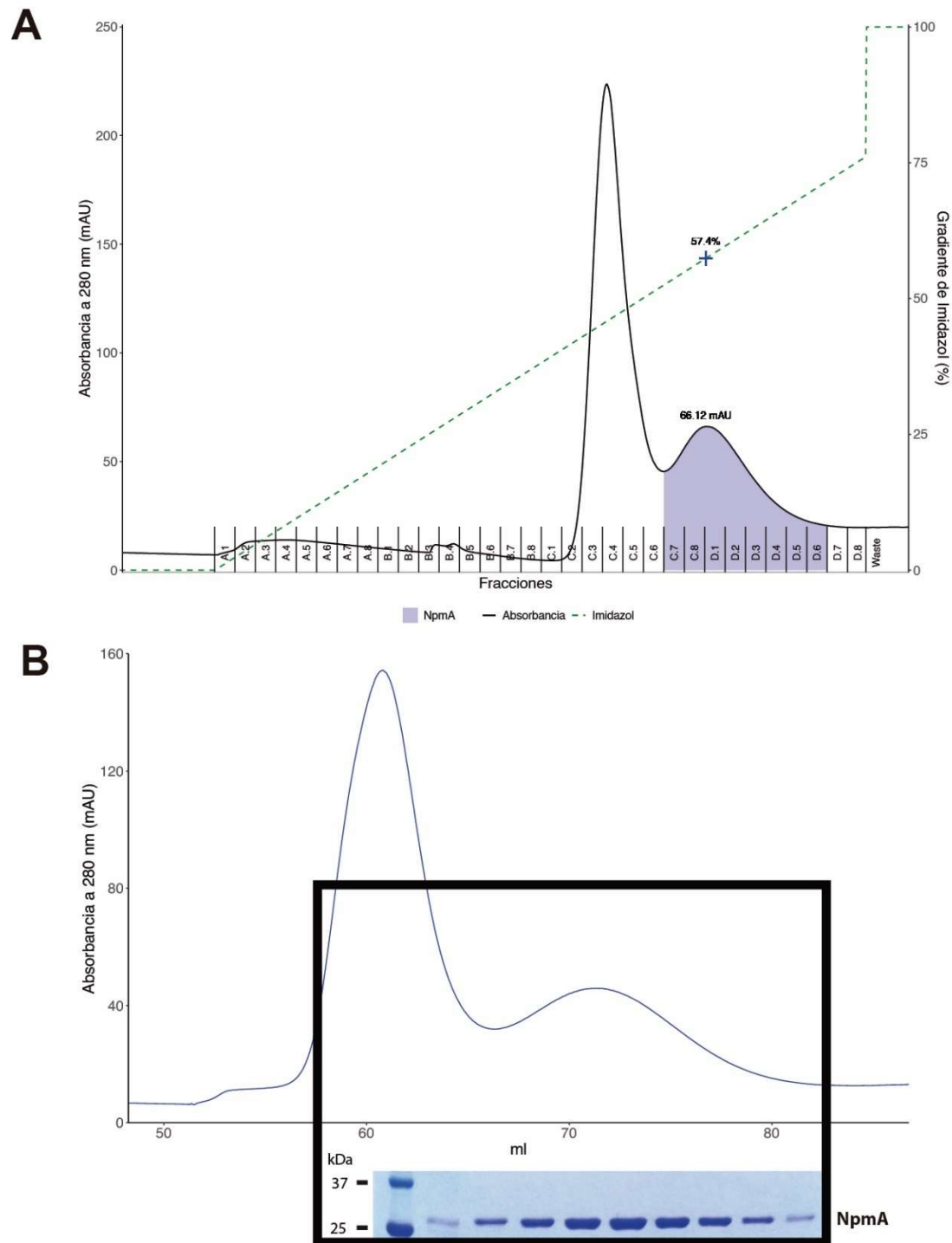
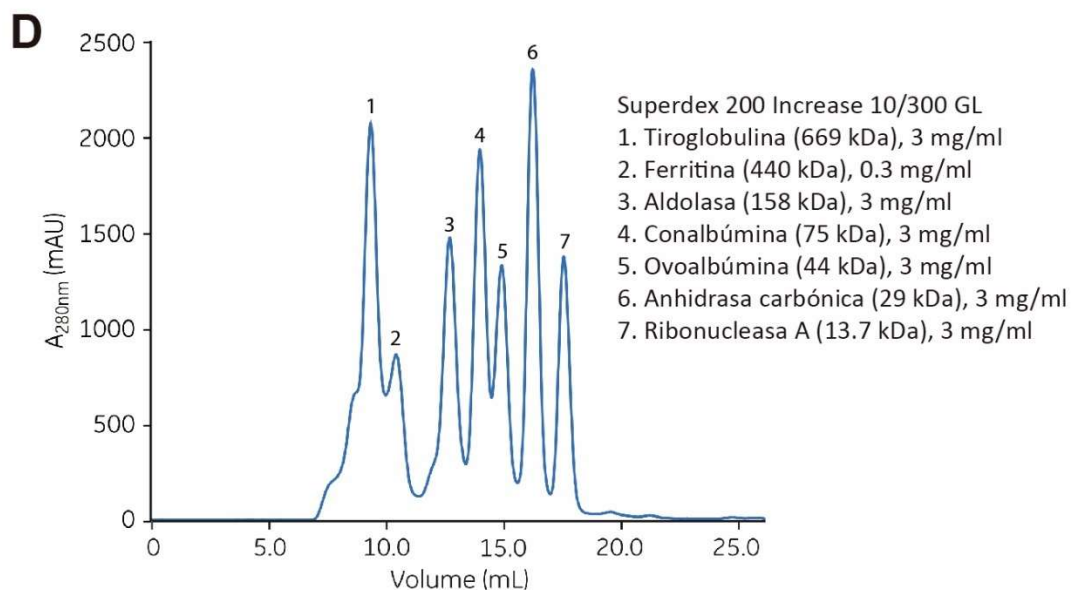
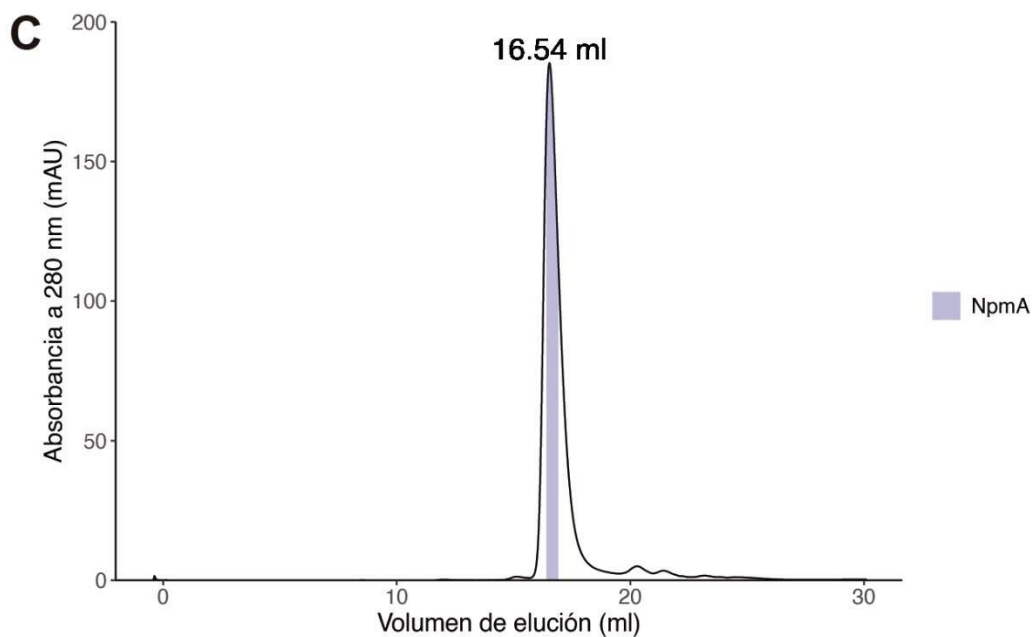


Figura 35. Purificación de la proteína recombinante NpmA: (A) cromatografía de afinidad mostrando en color la fracción conteniendo la proteína y (B) análisis de fracciones eluidas mediante SDS-PAGE.



Continuación de Figura 35. Purificación de la proteína recombinante NpmA: cromatograma de la exclusión molecular mostrando en color la proteína con el mayor pico de concentración (C) y cromatograma patrón utilizado para comparar el tamaño de la proteína (D).

b. ArmA y RmtB

Las proteínas ArmA y RmtB fueron purificadas bajo las mismas condiciones. Se utilizó un gradiente de concentración de 10 a 250 mM de imidazol en tampón B para eluir las proteínas de la columna de afinidad (Figura 36 A y B). Tanto en el caso de ArmA, como en el de RmtB, las proteínas eluyeron tarde en el gradiente. Al igual que con NpmA, las proteínas contenidas en las fracciones fueron concentradas y se realizó el último paso de purificación por cromatografía de exclusión (Figura 36 C y D). Mediante SDS-PAGE se determinó que las fracciones de ambas proteínas tenían una concentración alta (Anexo 3.7 y 3.8). En algunas ocasiones fue necesario separar las proteínas agregadas de las solubles y agregarles 40% de glicerol para su almacenamiento a -20°C .

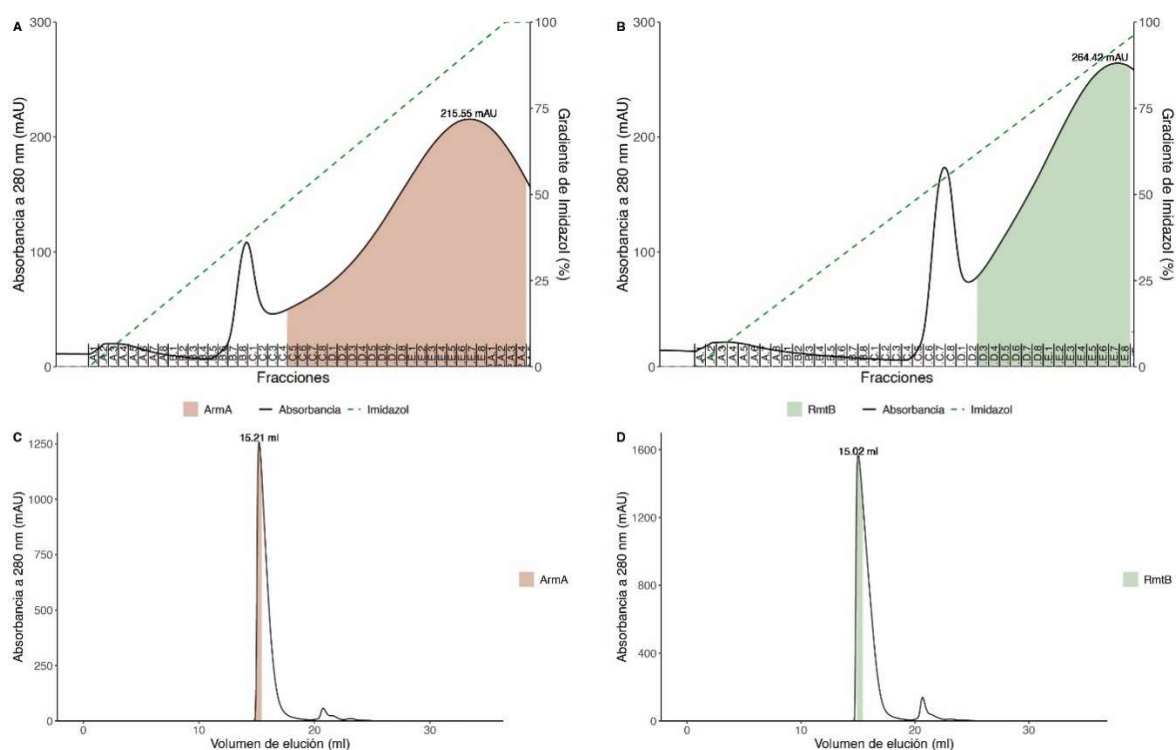


Figura 36. Cromatograma de purificación por afinidad de (A) ArmA y (B) RmtB; y por exclusión molecular de (C) ArmA y (D) RmtB. Las fracciones en color contienen la proteína purificada.

3.8. Detección de aptámeros con afinidad por las dianas purificadas

Inicialmente, se comprobó la hibridación de los cebadores para los ensayos de amplificación de los aptámeros por RT-PCR para lo cual se probaron diferentes temperaturas de hibridación en un protocolo de gradiente entre 54.1°C – 56°C . Se comprobó que no existe una diferencia notable en la amplificación en este rango de temperaturas (Figura 37), por lo que se eligió la temperatura de hibridación de 55°C .

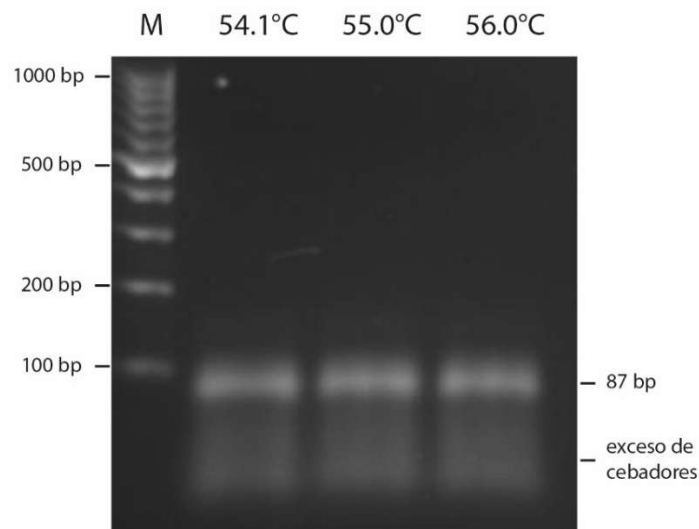


Figura 37. Amplificación de aptámeros por RT-PCR utilizando diferentes temperaturas de hibridación. Se utilizaron temperaturas de hibridación de 54.1°C – 56°C y no se observó diferencia entre éstas.

La misma comprobación se realizó para la amplificación por PCR de los aptámeros amplificados por RT-PCR como ADN molde. Se verificó que, bajo el rango de temperaturas de 53.5°C – 56.8 °C, las muestras amplifican (Figura 38). Nuevamente, se eligió la temperatura de 55°C como temperatura de hibridación.

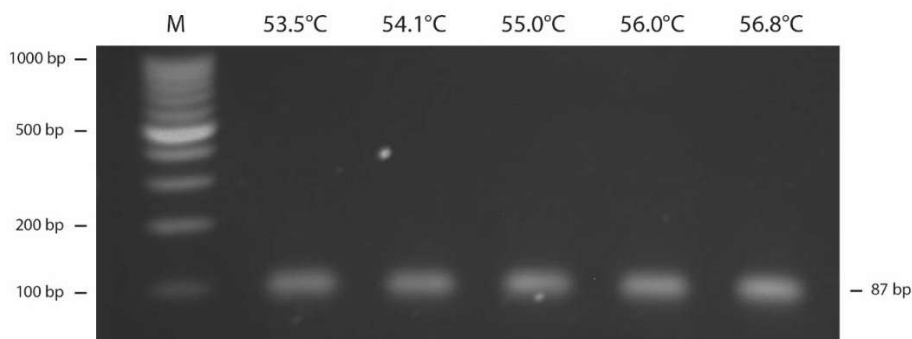


Figura 38. Amplificación de aptámeros por PCR utilizando diferentes temperaturas de hibridación. Se utilizaron temperaturas de hibridación de 53.5°C – 56.8°C y no se observó diferencia entre éstas.

Durante la optimización de las condiciones de SELEX se utilizó la proteína NpmA, purificada por cromatografía de afinidad y de exclusión molecular. Además de detectar aptámeros con afinidad por esta proteína, se encontraron aptámeros con afinidad por las perlas magnéticas utilizadas y se detectaron aptámeros inespecíficos en las 3 rondas de lavado realizadas. Estos resultados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa a partir de la amplificación por RT-PCR de las muestras (Figura 39).

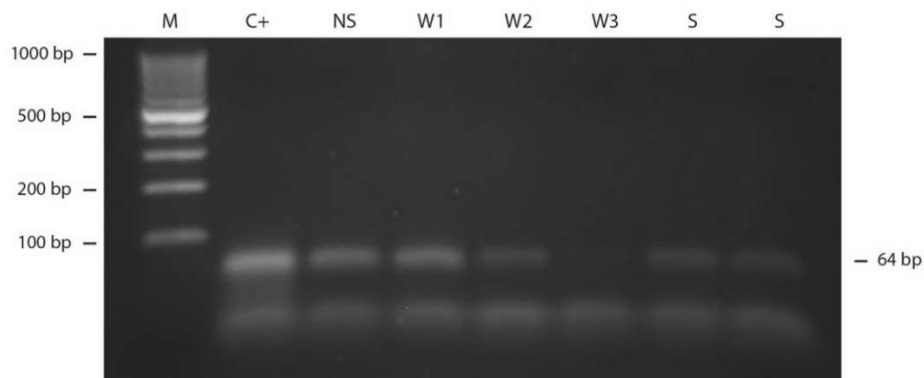


Figura 39. Aptámeros detectados mediante RT-PCR luego de 3 rondas de selección. En los carriles se observa: (M) marcador, (C+) control positivo de aptámeros de ARN, (NS) aptámeros de unión no específica, (W1-W3) sobrenadante después del lavado de cada ronda de selección y (S) aptámeros unidos a NpmA. Se utilizaron los cebadores que no contenían las dianas de restricción, por lo que el producto de amplificación tuvieron menor longitud.

Para mejorar la detección de los aptámeros con afinidad por las proteínas dianas, se aumentó el número de ciclos de SELEX a 5 y también se aumentó la cantidad de cebadores de la RT-PCR de 0.5 μ M a 10 μ M. Con esto, se recuperaron una mayor cantidad de aptámeros específicos con afinidad a las proteínas dianas y menor número de aptámeros inespecíficos (Figura 40). La metodología fue repetida para la selección de aptámeros para las otras 2 proteínas purificadas, ArmA y RmtB.

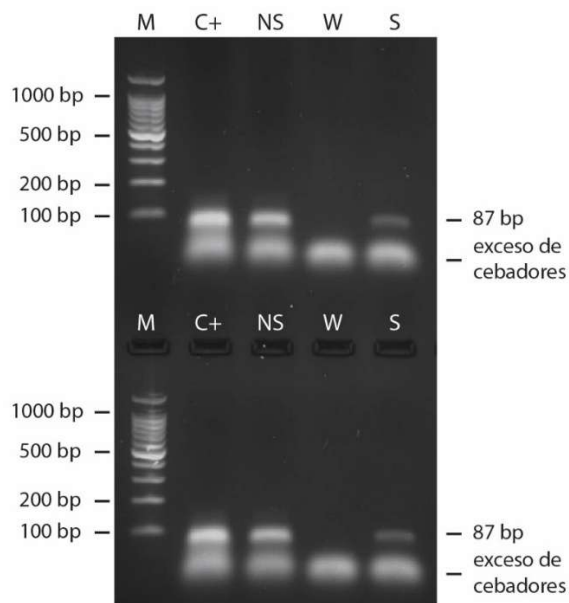


Figura 40. Aptámeros detectados mediante RT-PCR. En los carriles se observa: (M) marcador, (C+) control positivo de aptámeros de ARN, (NS) aptámeros de unión no específica, (W) sobrenadante después del lavado de la 5ta ronda de selección y (S) aptámeros unidos a las dianas ArmA (en la parte superior) y RmtB (en la parte inferior).

Los aptámeros de ADN, obtenidos por retrotranscripción y amplificación en cada ensayo de SELEX fueron guardados en librerías (Figura 41) y almacenados a -20°C para su posterior identificación y uso.

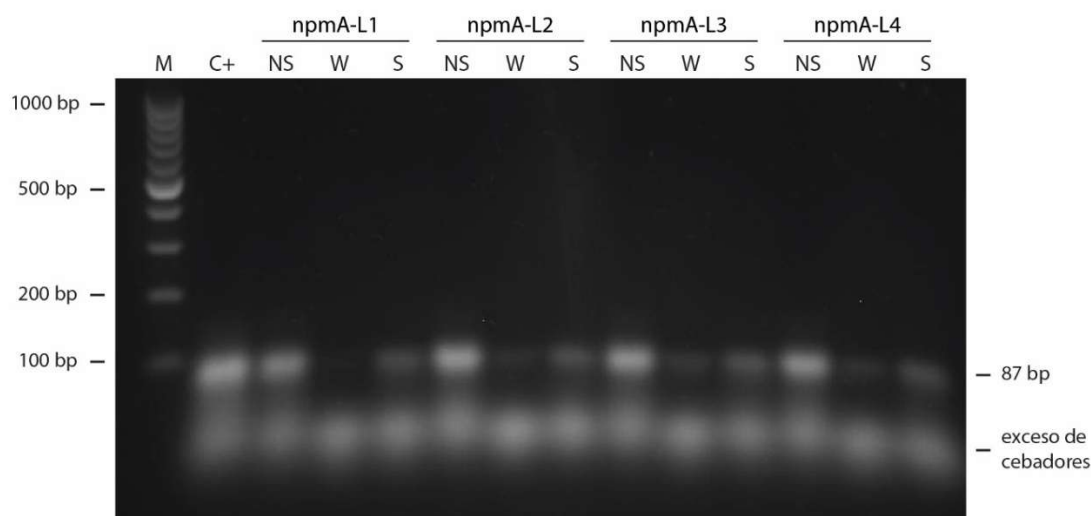


Figura 41. Librería de aptámeros con afinidad por NpmA detectados por RT-PCR. Se utiliza como nomenclatura el nombre de la proteína seguido del código de la librería. En los carriles se observa: (M) marcador, (C+) control positivo de aptámeros de ARN, (NS) aptámeros de unión no específica, (W) sobrenadante después del lavado de la 5ta ronda de selección y (S) aptámeros afines a la proteína de interés.

3.9. Identificación de aptámeros mediante clonaje y secuenciación

Los aptámeros de ADN utilizados en los clonajes fueron producto de una segunda amplificación por PCR de las librerías creadas con los aptámeros seleccionados con el método SELEX. Previa identificación de los aptámeros, se verificó la eficiencia de clonaje en los vectores plasmídicos pGEM-T y pBSMrnaStrp.

El método de *blue-white screening* con el vector pGEM-T mostró una baja eficiencia de ligación con los aptámeros. El mayor número de colonias transformantes fue obtenido a partir de la ligación *overnight* a 4°C; sin embargo, se obtuvo un elevado número de colonias azules (aquellas que recibieron el vector vacío) con respecto al número de colonias blancas (aquellas con el aptámero insertado en el vector) (Figura 42). Se verificó mediante PCR de colonia que las colonias blancas, en efecto, tenían los aptámeros insertados.

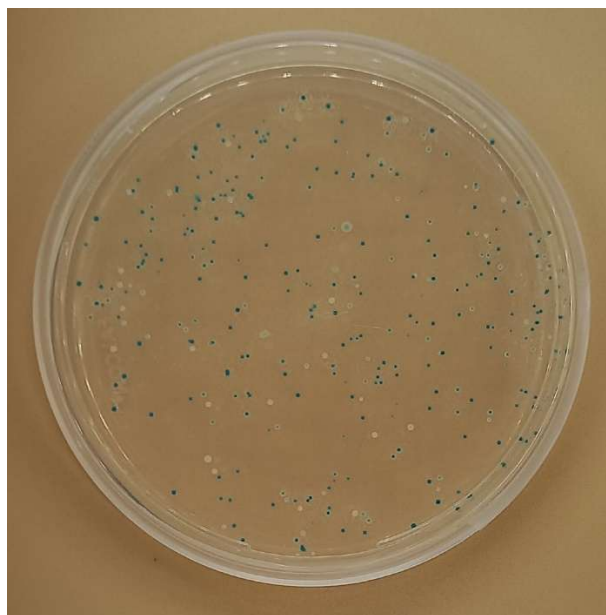


Figura 42. Identificación de aptámeros mediante *Blue-white screening* utilizando el vector pGEM-T. Las colonias blancas eran positivas para los aptámeros insertados en el vector, mientras que las colonias azules portaban el vector religado sin inserto.

El clonaje en el vector pBSMrnaStrp alcanzó una eficiencia de ~90%. Se detectó la presencia de los aptámeros insertados entre los sitios EcoRI y PstI del vector pBSMrna mediante PCR de colonia (Figura 43). Estos resultados fueron verificados 2 veces: la primera utilizando los cebadores universales T7 promoter (forward) y M13R-pUC (reverse), presentes en la secuencia del vector y una comprobación adicional con el cebador universal M13R-pUC y un cebador interno del aptámero (Figura 44).

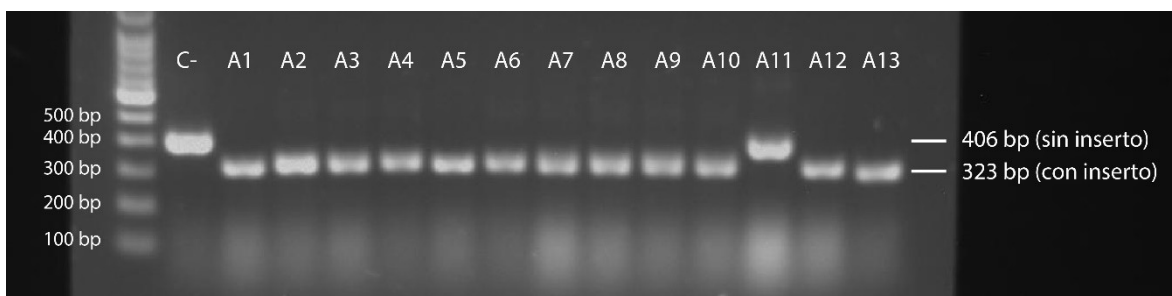


Figura 43. Resultados de la PCR de colonia para la verificación de aptámeros con afinidad por ArmA insertados en el vector pBSMrnaStrp entre los sitios EcoRI y PstI. Se observa que todas las colonias, a excepción de A11, eran positivas para la presencia de los aptámeros en el vector pBSMrnaStrp.

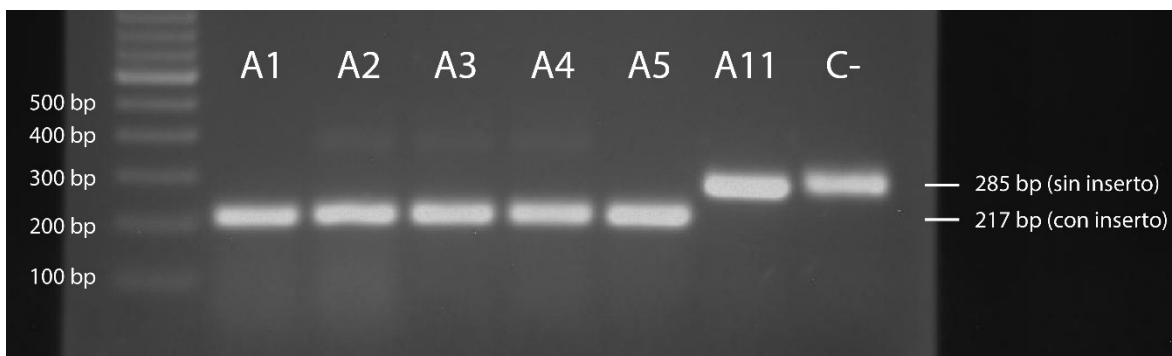


Figura 44. Resultados de la segunda verificación del clonaje aptámeros con afinidad por ArmA en el vector pBSMrnaStrp entre los sitios EcoRI y PstI. Se confirma que todas las colonias, a excepción de A11, eran positivas para la presencia de los aptámeros en el vector pBSMrnaStrp.

La detección de aptámeros también se realizó para las demás proteínas, NpmA y RmtB (Figura 45). En total, se identificaron alrededor de 75 colonias positivas con el vector pBSM expresando los aptámeros. A partir de éstas, se crearon librerías con las colonias criopreservadas y los plásmidos purificados de cada una. Un lote de plásmidos fue enviado a secuenciar entre los que se incluían los vectores pBSMrna y pGEM-T conteniendo los aptámeros. Se ordenó la secuenciación en ambos sentidos del ADN.

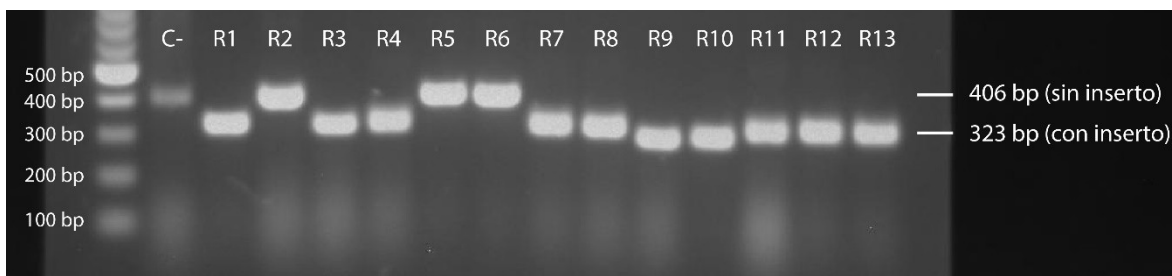


Figura 45. PCR de colonia para la verificación de aptámeros con afinidad por RmtB insertados en el pBSMrnaStrp entre los sitios EcoRI y PstI. Se observa que todas las colonias eran positivas para la presencia de los aptámeros en el vector pBSMrnaStrp, a excepción de las colonias R2, R5 y R6.

Las secuencias resultantes de la secuenciación SANGER fueron verificadas y alineadas. Se identificaron secuencias para los aptámeros con afinidad por las proteínas ArmA (Figura 46A), NpmA (Figura 46B) y RmtB (Figura 46C). No se encontraron secuencias de aptámeros repetidas, a pesar de que fueron amplificadas por PCR.

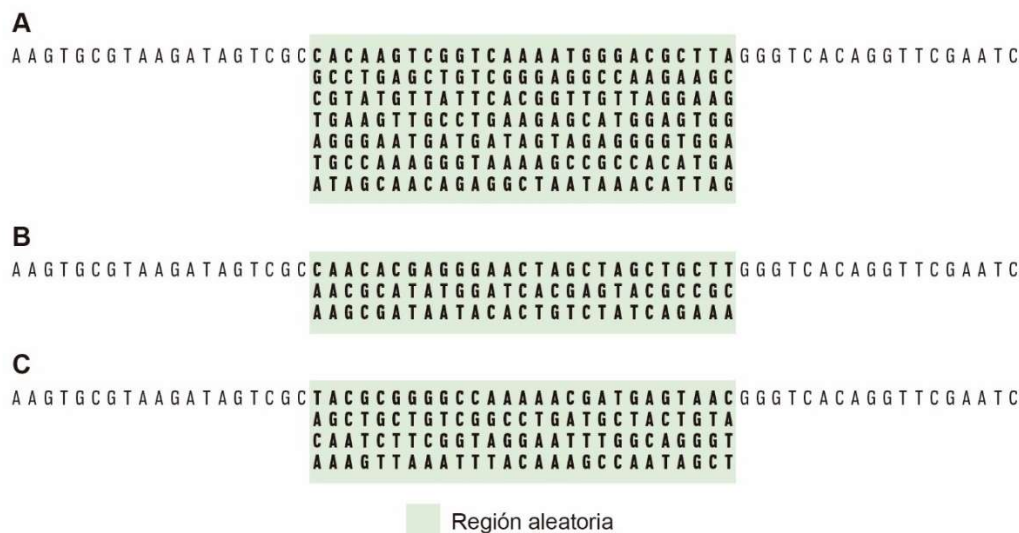


Figura 46. Secuencias de aptámeros con afinidad a las proteínas recombinantes (A) ArmA, (B) NpmA y (C) RmtB, obtenidas mediante secuenciación SANGER. La primera secuencia de cada bloque muestra la secuencia fija de los aptámeros.

3.10. Pruebas funcionales

Los genes *armA*, *rmtB* y *npmA* fueron clonados exitosamente en los vectores pGDP3 y pGDP4 y transformados en *E. coli* cepa DH5 α para la expresión de los factores de resistencia en los ensayos de inhibición de los aptámeros (Anexo 3). Se determinaron las MICs para 6 aminoglucósidos: amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, estreptomicina y tobramicina; mediante ensayos de microdilución en placa (Figura 47).

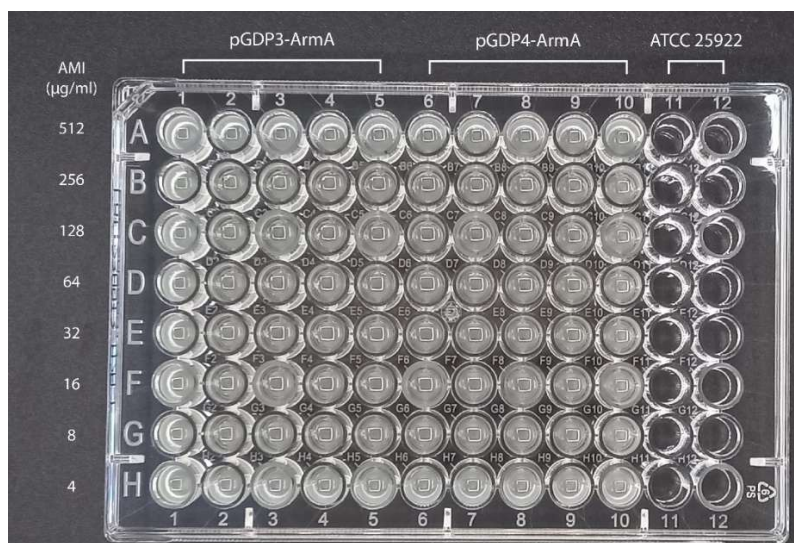


Figura 47. Ensayo de microdilución en placa para la determinación de la MIC de amikacina (AMI) de cepas de *E. coli* DH5 α transformadas con los vectores pGDP3-ArmA y pGDP4-ArmA. En la figura se observa el crecimiento de cepas en todas las concentraciones de amikacina utilizadas.

Las cepas transformadas con ambos vectores pGDP3 (con promotor fuerte) y pGDP4 (con promotor débil), conteniendo las secuencias codificantes de los distintos factores de resistencia mostraron un alto nivel de resistencia. La MIC de la amikacina, gentamicina y kanamicina superó la concentración máxima utilizada en los ensayos. Se observó que NpmA es la única metiltransferasa que confiere resistencia a neomicina (aunque confiere menor nivel a la amikacina y gentamicina, comparándola con las demás enzimas) y ninguna enzima fue capaz de conferir resistencia a estreptomycin (Tabla 16).

Tabla 16. MIC ($\mu\text{g/ml}$) de los diferentes constructos transformados en *E. coli* DH5 α

Plásmido	AMI	GEN	KAN	NEO	STR	TOB
pGDP3-ArmA	>512	>512	>512	≤ 4	≤ 4	512
pGDP4-ArmA	>512	>512	>512	≤ 4	≤ 4	512
pGDP3-RmtB	>512	>512	>512	≤ 4	≤ 4	512
pGDP4-RmtB	>512	>512	>512	≤ 4	≤ 4	512
pGDP3-NpmA	128	64	>512	128	≤ 4	512
pGDP4-NpmA	128	64	>512	128	≤ 4	512

Los vectores pBSM-A* (en adelante, el * simboliza un número, correspondiente al constructo) conteniendo los aptámeros con afinidad para ArmA fueron transformados en células electrocompetentes de pGDP4-ArmA y, mediante PCR de colonia, se identificaron las colonias dobles transformantes (Figura 48). A partir de estos resultados, se identificó al menos 1 colonia para cada vector pBSM y estas cepas se criopreservaron para su posterior uso.

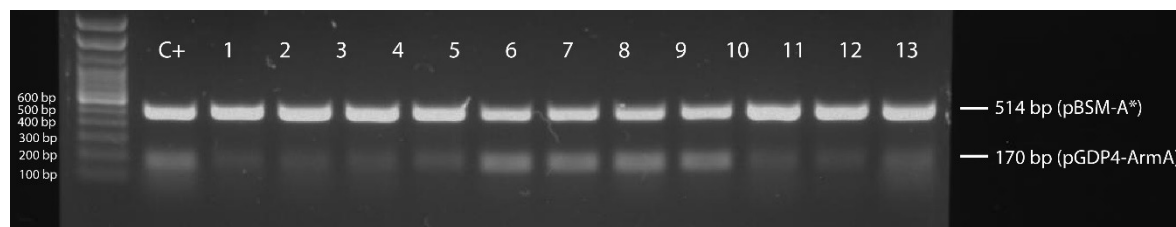


Figura 48. Verificación de dobles transformantes de pBSM-A* y pGDP4-ArmA mediante PCR de colonia. Se observa la amplificación de ambos fragmentos, indicando la presencia de ambos vectores en la misma célula.

A partir de una segunda verificación por purificación y digestión de plásmidos con XhoI, se observó que los clones de una misma cepa presentaban ambos vectores, aunque mostraban diferentes proporciones de ambos (Figura 49). En las digestiones se utilizó 150 ng y 400 ng de los vectores usados como control y las muestras, respectivamente.

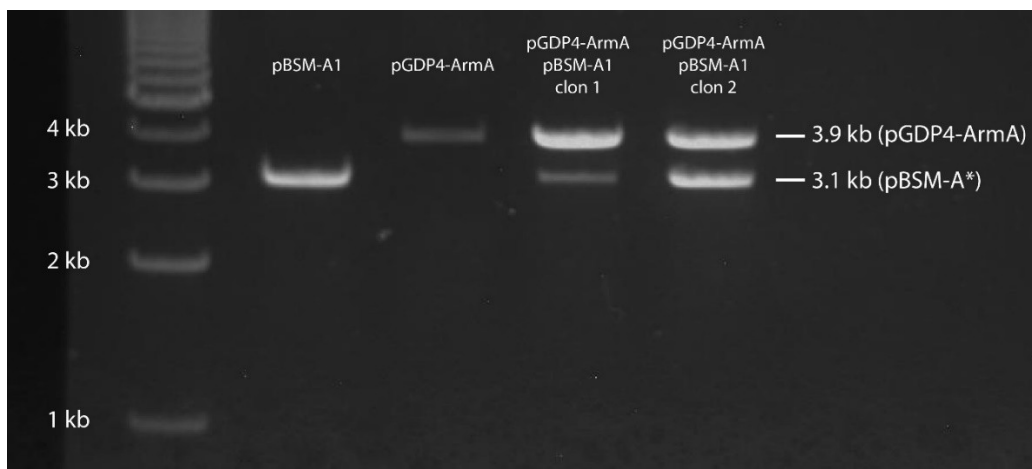


Figura 49. Verificación de dobles transformantes de pBSM-A1 y pGDP4-ArmA mediante digestión de vectores plasmídicos con XhoI. Se observa que los clones 1-2 presentan ambos vectores y cada uno tiene una intensidad diferente.

Se hizo una verificación rápida de las colonias a utilizar en las pruebas de microdilución estándar, para comprobar la presencia de los vectores pBSM-A* en las cepas cotransformadas con ambos vectores. Se encontró que la mayoría de las colonias verificadas ya no mantenía el vector (Figura 50).



Figura 50. Verificación de las colonias previo a los ensayos de microdilución. En esta verificación, la mayor cantidad de cepas, que anteriormente habían sido positivas para los vectores pGDP4-ArmA y pBMS-A*, no amplificaron el fragmento, indicando la ausencia del vector pBSM-A*.

Este resultado nos llevó al estudio de las secuencias de los vectores, encontrándose que éstos poseen el mismo origen de replicación, lo que pudo ocasionar la pérdida selectiva del vector en algunas colonias. Con estas cepas no fue posible realizar los ensayos de microdilución, por lo que se diseñó el vector pARC-ArmA.

El vector pARC-ArmA fue sometido a verificaciones para comprobar el tamaño del constructo y su funcionalidad. Primero, se confirmó que el tamaño del constructo (~3.5 kb) coincide con el tamaño de la secuencia diseñada (Figura 51). Luego, se confirmó que el vector es funcional, ya que, las células transformadas con este vector eran capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de kanamicina (256 µg/ml), al igual que lo hacen las cepas transformadas con el vector pGDP4-ArmA (Figura 52).

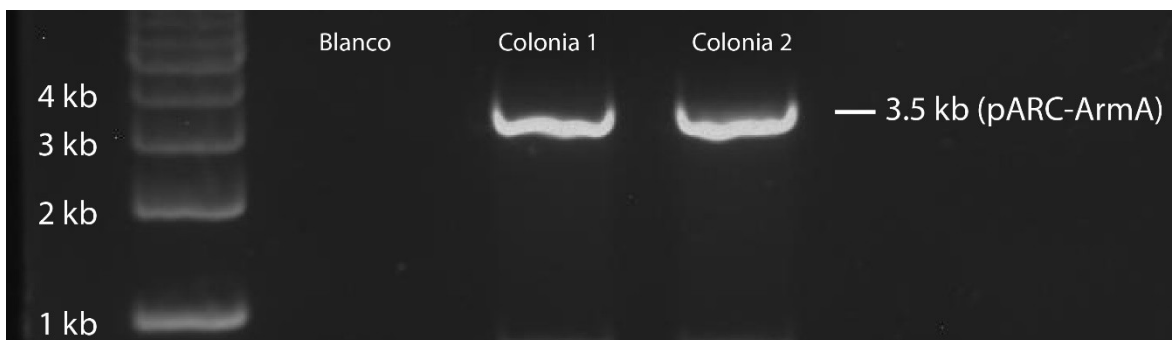


Figura 51. Comprobación del vector pARC-ArmA mediante digestión con NdeI del ADN plasmídico. Los plásmidos de las 2 colonias utilizadas portaban el vector.

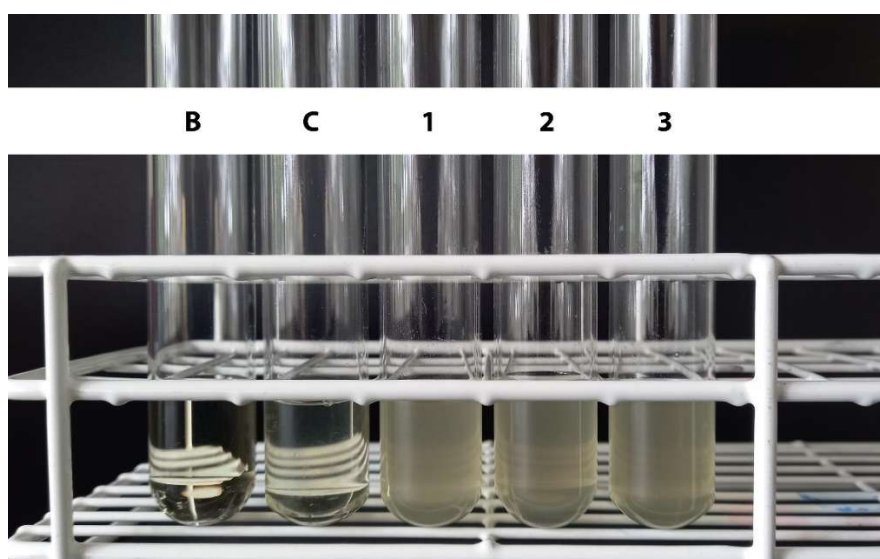


Figura 52. Prueba funcional del cepas de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pARC-ArmA en presencia de 256 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. De izquierda a derecha: B, blanco (caldo LB sin inocular); C, control (DH5 α sin transformar); 1, cepa transformada con pGDP4-ArmA y, 2 – 3 cepas transformadas con pARC-ArmA. Se observa que las cepas que contenían el vector pARC-ArmA eran capaces de crecer en esta concentración de antibiótico.

Al igual que con los vectores pGDP, se verificó el nivel de resistencia que confería ArmA en el vector pARC. Se realizaron los ensayos de microdilución en placa con los 6 aminoglucósidos, partiendo de una concentración máxima de 2048 $\mu\text{g/ml}$. Así, se determinó que la MIC para amikacina y gentamicina es 1024 $\mu\text{g/ml}$; kanamicina >2048 $\mu\text{g/ml}$; neomicina y estreptomina ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$; y, tobramicina 512 $\mu\text{g/ml}$.

Adicionalmente, se confirmó mediante RT-PCR que las células cotransformadas con los vectores pBSM-A* y pARC-ArmA son capaces de expresar los aptámeros de ARN (Figura 53).

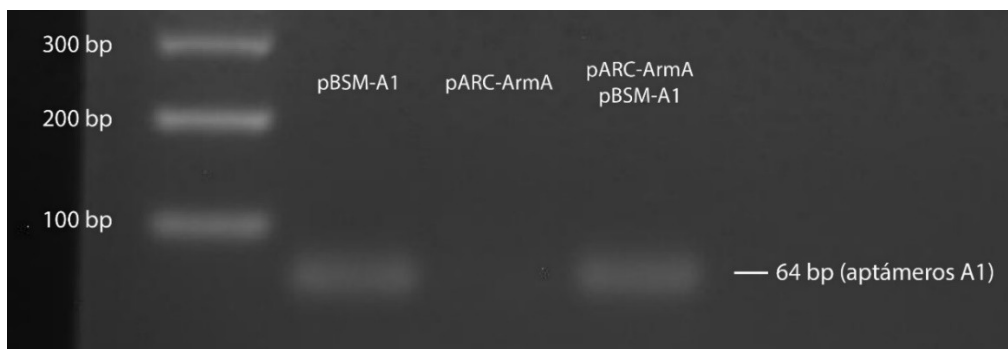


Figura 53. Ensayo de expresión de aptámeros de ARN en cepas de *E. coli* DH5 α cotransformadas con los vectores pARC-ArmA y pBSM-A1. Se observa que las células dobles transformantes expresan los aptámeros de ARN.

Para las pruebas funcionales no fue requerida la verificación por PCR, ya que ambos los vectores poseen marcadores de selección diferentes. Pero se verificó la expresión de los aptámeros en las cepas cotransformadas con ambos vectores mediante RT-PCR.

Un total de 24 vectores pBSM-A* fueron cotransformados independientemente con el vector pARC-ArmA en células de *E. coli* DH5 α y se obtuvieron colonias dobles transformantes. Sin embargo, al realizar los ensayos de microdilución en placa, no se observó que alguna cepa manifestara una disminución de la MIC para ninguno de los aminoglucósidos utilizados (amikacina, gentamicina, kanamicina y tobramicina) (Figura 54).

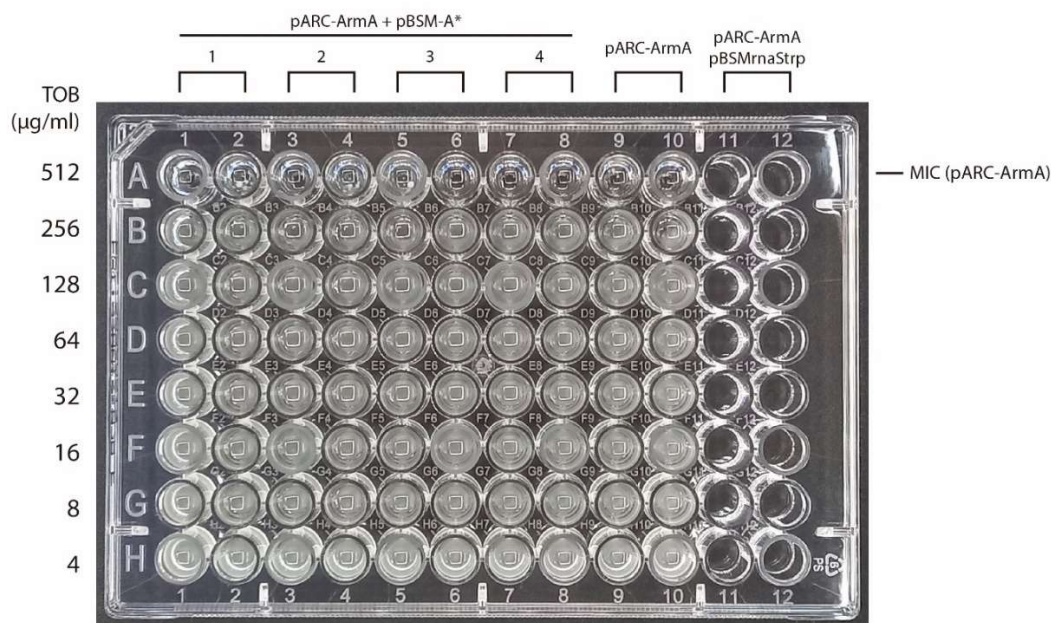


Figura 54. Ensayo de microdilución en placa con cepas cotransformadas con los vectores pARC-ArmA y pBSM-A*, en presencia de tobramicina. Se observa que las células expresando los aptámeros no eran capaces de inhibir la proteína ArmA, que les confería una MIC de 512 μ g/ml.

3.11. Interacción proteína-ARN

Se realizó una electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 10% en sistema Tris-glicina-EDTA a 4°C para las 3 enzimas purificadas mediante cromatografía de afinidad y de exclusión molecular pudieron. Se observó que ~5 µg de cada proteína es suficiente para identificarlas visualmente mediante tinción con azul de Coomassie (Figura 55).

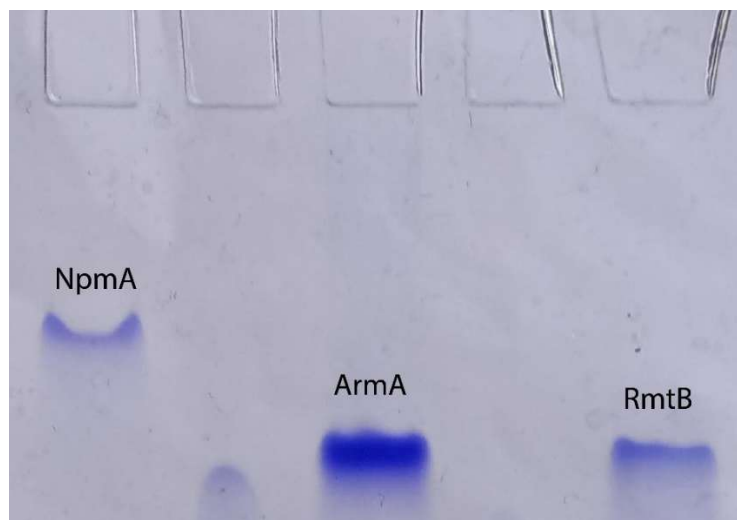


Figura 55. Gel nativo de poliacrilamida al 10% con las proteínas NpmA, ArmA y RmtB, purificadas mediante cromatografía de afinidad y exclusión molecular.

Las proteínas purificadas a partir de los extractos celulares de las células cotransformadas con el pET28-ArmA y el pBSM-A* e inducidas con diferentes concentraciones de IPTG, fueron corridas en los geles de poliacrilamida al 10% a 4°C. Se utilizaron 4 µg y 8 µg de proteína total de cada muestra. Después de la corrida y la tinción con GelGreen, se observó que una fracción proteica permanecía en los pocillos y que tanto la proteína control ArmA como las proteínas coexpresadas con los aptámeros emitían fluorescencia, indicando la presencia de ácidos nucleicos (Figura 56).

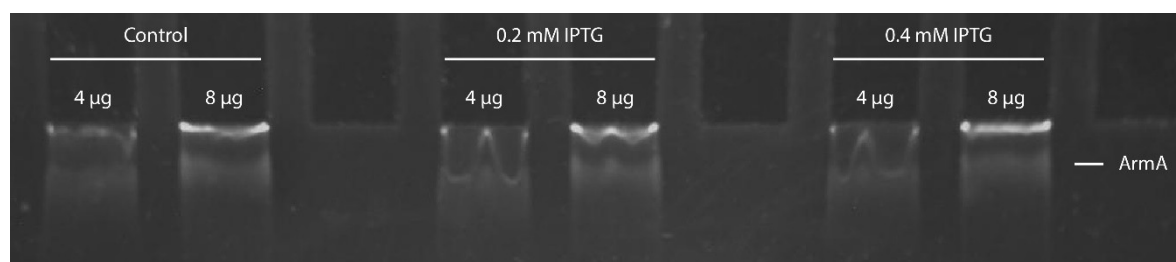


Figura 56. Gel nativo de poliacrilamida al 10% teñido con GelGreen. Se muestran las proteínas purificadas a partir de extractos celulares de células de *E. coli* cepa BL21(DE3) cotransformadas con el pET28a-ArmA y el pBSM-A1. Bajo luz ultravioleta se puede observar la presencia de ácidos nucleicos atrapados en los pocillos y una banda difusa en el gel, correspondiente a ArmA.

Al igual que con ArmA, después de la corrida y la tinción con GelGreen, se observaba una fracción proteica en los pocillos y la posible presencia de ácidos nucleicos unidos tanto a la proteína de control RmtB, como a las proteínas coexpresadas con los aptámeros (Figura 57).

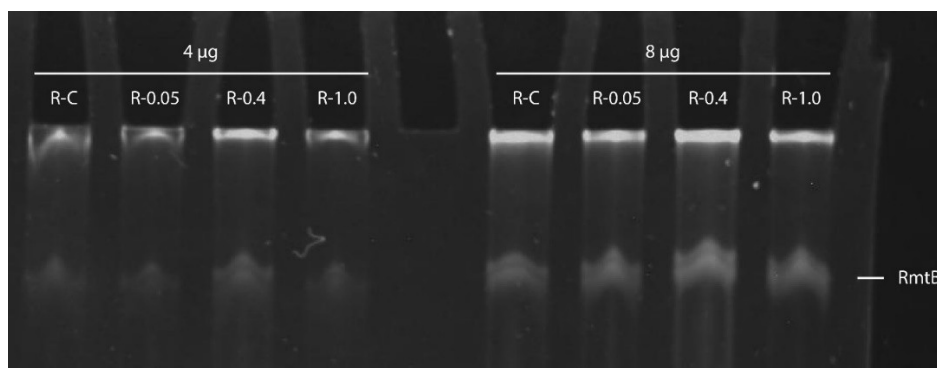


Figura 57. Gel nativo de poliacrilamida al 10% teñido con GelGreen. Se muestran las proteínas purificadas a partir de extractos celulares de células de *E. coli* cepa BL21(DE3) cotransformadas con los vectores pET28a-RmtB y pBSM-R1. Bajo luz ultravioleta se puede observar la presencia de ácidos nucleicos atrapados en los pocillos y una banda difusa en el gel, correspondiente a RmtB.

Las pruebas de disociación de los ácidos nucleicos mediante el aumento de la concentración de NaCl en la purificación mostraron una leve disociación entre los ácidos nucleicos con afinidad a la proteína en el control, pero no se pudo confirmar si los aptámeros se mantienen unidos o no a la proteína. En este ensayo se observó una banda adicional que no corresponde a nuestra proteína de estudio (Figura 58).

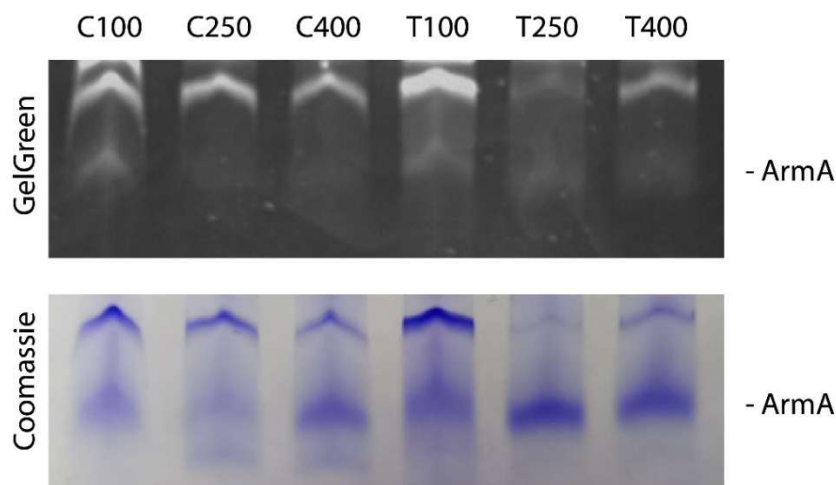


Figura 58. Gel nativo de poliacrilamida al 10% teñido con GelGreen (superior) y posteriormente con azul de Coomassie (inferior). Se muestran las proteínas purificadas a partir de extractos celulares de células de *E. coli* cepa BL21(DE3) cotransformadas con los vectores pET28a-ArmA y pBSM-A1. Se aprecia una banda contaminante con interacción de ácidos nucleicos (fluorescencia bajo luz ultravioleta) y de naturaleza proteica (tinción con Coomassie).

Capítulo 4. Discusión

4.1. Aislamiento e identificación de *E. coli*

Si bien, el método convencional demostró ser muy efectivo para el aislamiento e identificación de cepas de *E. coli*, el método molecular utilizado para la confirmación demostró que existen especies que pueden ser identificadas incorrectamente si se usan solamente los métodos convencionales. Además, el método convencional no permite la detección de cepas de *E. coli* que presenten actividad β -D-glucuronidasa, dejando por fuera a distintos grupos como la *E. coli* O157:H7.

En esta investigación, un aislado amplificó los genes *lacZ*, *cyd* y *lacY*, pero no el gen *uidA*. La especie que exhibió este patrón no fue definida por los autores de la PCR Multiplex, aunque se menciona que *Klebsiella sp.* y *Raoutella sp.* Frecuentemente, eran negativa para *uidA*, *lacZ* y *lacY* (Horakova et al., 2008). Sin embargo, el fenotipo de estas bacterias no concuerda con el obtenido en agar EMB (colonias verdes con brillo metálico y centro oscuro). Otras especies como *Citrobacter braakii*, *Enterobacter asburiae*, *Kluyvera georgiana*, *Pantoea agglomerans* o *Phytobacter diazotrophicus* sí se han descrito con el mismo fenotipo de *E. coli* en agar EMB (Antony et al., 2016; Kim et al., 2016); sin embargo, no está descrito que estas especies presenten actividad β -D-glucuronidasa, como se observó en el caldo EC-MUG.

4.2. Fenotipos y genotipos de resistencia

La identificación de cepas resistentes a estas 3 familias de antibióticos concuerda con los resultados publicados en Latinoamérica. En una revisión de la región de Norteamérica, Centroamérica y el Caribe se publicó que el 93 % de los estudios realizados sobre resistencia antimicrobiana encontraron bacterias resistentes a los aminoglucósidos, el 92 % encontró resistencia a cloranfenicol y el 100 %, resistencia a tetraciclinas. En las publicaciones de Suramérica, se encontró un 89, 83 y 97 % de cepas resistentes a los aminoglucósidos, anfenicoles y tetraciclinas, respectivamente (Domínguez et al., 2021).

En este estudio se encontró que el 80 % de los aislados era resistente a, al menos un aminoglucósido, el 37 % era resistente a tetraciclina y 19 % era resistente a cloranfenicol. Anteriormente, en muestras procedentes de aguas superficiales y heces de animales de granja y humanos de comunidades de Panamá Oeste y Colón, se encontró menor incidencia de cepas de *E. coli* resistentes a aminoglucósidos (2 %), pero hallaron mayor prevalencia de cepas resistentes a tetraciclina (75 %) y cloranfenicol (~25 %) (Ramírez-Bayard et al., 2023). En cepas de *E. coli* aisladas de gatos domésticos en Panamá Centro, se encontró una alta prevalencia de resistencia a gentamicina (58 %), kanamicina (25 %) y tetraciclina (21 %) (Núñez-Samudio et al., 2024).

Los genes de resistencia a los aminoglucósidos más frecuentes fueron *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib* y *ant(3'')-Ia*. Los genes *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id* (llamados *strA-strB* o *strAB*) codifican para dos O-fosfotransferasas que confieren resistencia a estreptomina y suelen encontrarse juntos (Wellner et al., 2024) y *ant(3'')-Ia* codifica para una O-nucleotidiltransferasa, que

también confiere resistencia a estreptomina. Estos 3 genes fueron responsables de 24/26 fenotipos de resistencia a estreptomina; aunque, también fueron detectados en 4 aislados que no presentaban este fenotipo. Estos genes son comúnmente detectados entre cepas patógenas de *E. coli* aisladas de aguas residuales (Park et al., 2024).

El gen *aph(3')-Ia*, también detectado en este estudio, confiere resistencia a kanamicina y neomicina (Prabha et al., 2023). Este gen fue el responsable de 6/13 fenotipos de resistencia a kanamicina y 6/40 fenotipos de resistencia a neomicina. Está descrito que este gen es raramente detectado (Livermore et al., 2001). No se lograron identificar los genes responsables de los demás fenotipos de resistencia, a pesar de que se realizó la detección de otros genes como *aac(6')-Ib* y las metiltransferasas del ARNr 16S, que confieren resistencia a kanamicina; y la metiltransferasa del ARNr 16S *npmA*, que confiere resistencia a kanamicina y neomicina.

En general, los fenotipos de resistencias a gentamicina no pudieron ser explicadas porque, a excepción del gen *aac(3)-IIa* que fue detectado en solo 2 aislados, el resto de los genes detectados no confiere resistencia a este antibiótico. Este aminoglucósido es comúnmente utilizado en formulaciones de ungüentos, cremas y soluciones oftálmicas, que son frecuentemente adquiridas sin prescripción médica. La selección de cepas resistentes a este antibiótico podría ser entonces atribuidas a la falta de regulaciones, su mal uso y consecuente mala disposición. Investigaciones han concluido que las concentraciones sub-inhedoras de gentamicina puede contribuir al incremento de la abundancia de genes de resistencia en el ambiente. Además, las concentraciones sub-inhedoras de gentamicina promueven la movilización de genes de resistencia que pueden diseminarse en el microbioma ambiental, humano y animal (Sanchez-Cid et al., 2022).

Los aminoglucósidos también son utilizados con frecuencia en la cría de animales de consumo para el tratamiento de infecciones intestinales y, aunque la Ciudad de Panamá no es conocida por su amplia industria agrícola, en la provincia se centran actividades avícolas para la producción de pollo y huevos (Lasso, 2024; Rodríguez P., 2017). La cercanía de estas actividades con el centro urbano y las fuentes de agua podría explicar algunas de las resistencias a esta clase de antibióticos, ya que, el alto número de aislados resistentes se asemeja a los encontrados en ambientes agrícolas de producción de animales de consumo. En Bangladesh, se estudió la prevalencia de cepas resistentes de *E. coli* provenientes de la cría de aves de corral y se encontró que hasta un 100% de las cepas eran resistentes a gentamicina, estreptomina y neomicina (Islam et al., 2023). En Corea, se encontró un 56.3% de cepas de *E. coli* resistentes a estreptomina, procedentes de granjas bovinas, y se demostró que los genes que conferían estas resistencias podían ser transferidos mediante conjugación (Belayneh et al., 2017). En España, se estudió la resistencia de *E. coli* en la producción de cerdos y se encontró que el 91.6% y 33.5% de los aislados eran resistentes a estreptomina y gentamicina, respectivamente (Garcías et al., 2024).

No se lograron detectar los genotipos de resistencia a los aminoglucósidos de 51 aislados. La principal complejidad en la detección de estos genes fue el gran número existente, seguido por la complejidad de los patrones fenotípicos de resistencia. Desde el siglo XX, se considera

una tarea desafiante la detección de estos genes de resistencia debido a la diversidad de enzimas modificadoras de aminoglucósidos y a la dificultad de predecir los patrones de resistencia de cada una (Wright, 1999). Además, las enzimas descritas no corresponden al total de enzimas posibles, esto se afirmó en un estudio de secuencias que, analizando cerca de 1 millón de genomas, predijo más de 34 mil genes únicos de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, agrupados en 7612 grupos, de los que solo se han descrito 88 (Lund et al., 2023). Tampoco se puede descartar que algunos aislados con bajos niveles de resistencia presenten impermeabilidad (Livermore et al., 2001).

En contraste con los aminoglucósidos, se detectaron todos los genotipos de resistencia de las cepas resistentes a tetraciclina. Durante los ensayos de detección, se observó que el vector pGDP4 tet(A), utilizado como control positivo en las reacciones de PCR, no amplificó. Se realizó un análisis de la secuencia depositada por el autor del vector (Cox et al., 2017) en el sitio addgene (www.addgene.org) y no se encontraron los sitios de hibridación de los cebadores porque la secuencia del gen provenía de la especie *Morganella morganii* y los codones habían sido optimizados para su expresión en *E. coli*. Aun así, se enviaron a secuenciar de forma aleatoria diferentes productos de PCR, comprobando la identidad de los genes *tet(A)* detectados (Anexo 1.6 y 3.1).

En general, los genes de resistencia a tetraciclina más prevalentes se encuentran asociados a plásmidos y codifican para bombas de eflujo, como son los genes *tet(A)* y *tet(B)*. En nuestro estudio, se detectaron estos 2 genes entre los aislados resistentes a tetraciclina, en ocasiones se encontraron juntos, y el más frecuente fue el gen *tet(A)*. En estudios anteriores en Panamá, se detectó la presencia de estos genes en ~45% de los aislados de *E. coli* provenientes de muestras de agua superficiales, heces de animales y humanos (Ramírez-Bayard et al., 2023); y, en Latinoamérica y el Caribe, también se describen como los 2 genes detectados con mayor frecuencia (Vásquez-Jaramillo et al., 2023).

En los análisis estadísticos realizados no se pudo determinar la asociación entre los genes *tet(A)* y *tet(B)* y las MICs de tetraciclina obtenidas. Sin embargo, esto puede deberse al rango de concentraciones utilizadas (límite superior 128 µg/ml) y por el bajo número de aislados portadores del gen *tet(B)* (8 aislados). Se ha descrito que las cepas portadoras del gen *tet(A)* tienen MIC entre 32 – 128 µg/ml; mientras que, las cepas portadoras de *tet(B)* tienen MICs entre 128 – 256 µg/ml (Chalmers et al., 2010). Los resultados obtenidos son consistentes con estos valores, ya que, las cepas portadoras del gen *tet(B)* reportaron MICs ≥ 128 µg/ml, aunque, las cepas portadoras de *tet(A)* presentaron un rango más amplio de MICs entre 16 µg/ml y ≥ 128 µg/ml.

En este estudio se encontró que todas las cepas resistentes a cloranfenicol eran resistentes a otras clases de antibióticos y la mayoría eran multirresistentes. Este comportamiento ha sido descrito anteriormente en cepas patógenas de *E. coli* aisladas de plantas de tratamiento de aguas residuales, donde se encontró que todas las cepas resistentes a cloranfenicol tenían resistencia concomitante a otros antibióticos como tetraciclina y ampicilina (Park et al., 2024). Cabe resaltar que, aunque algunas cepas no hayan sido categorizadas como resistentes, esta investigación solo se centra en las principales clases de antibióticos dirigidos al ribosoma y

sus resistencias, pero se ha descrito que las resistencias a estas clases está asociadas a las resistencias a otras familias, entre las que se incluyen los β -lactámicos y fluoroquinolonas (Bodendoerfer et al., 2020). Por lo que, un número mayor de cepas de las enumeradas aquí podrían ser multirresistentes.

La prevalencia de los genes de resistencia a los anfenicol en la literatura consultada es variada, pero los genes más prevalentes son los que se detectaron en este estudio: *floR*, *cmlA* y *CatA1*. Por ejemplo, en Perú, el gen *floR* era el más frecuente entre cepas de *E. coli* resistentes a cloranfenicol, aisladas de heces de cerdos (Espinoza et al., 2023); en China, el gen *floR* fue detectado en el 80% de las cepas de *E. coli* aisladas de muestras de agua (Liao et al., 2021); en Pakistán, se detectaron los genes *cmlA* y *floR*, siendo el primero el más prevalente en las muestras de aguas residuales municipales (Inuwa et al., 2022); en Nigeria, los genes más prevalentes en aguas residuales farmacéuticas eran *CatA1* y *cmlA* (Obayiuwana & Ibekwe, 2020); y en Taiwán, un estudio longitudinal (2003-2007) reveló la duplicación del número de cepas de *E. coli* resistentes a florfenicol, portadoras del gen *floR* (Kuo et al., 2009). Este último estudio encontró que las cepas portadoras del gen *floR* con frecuencia portaban el gen *cmlA*, tal y como se presentó en el 42% (8/19) de los aislados resistentes a cloranfenicol de este estudio.

Debido a la falta de información sobre el nivel de resistencia a cloranfenicol que confiere cada gen de resistencia, no se pudieron comparar los resultados obtenidos. Esta brecha sigue abierta para futuras investigaciones. Se requiere un número superior de aislados conteniendo cada gen y, de ser posible, obtener cepas que contengan solo un gen de resistencia a la vez. Según los resultados obtenidos, tanto la acetiltransferasa *CatA1* como los transportadores *floR* y *cmlA* confieren el mismo rango de resistencias a cloranfenicol, comprendido entre 32 – 256 $\mu\text{g/ml}$.

Se encontró que el gen de resistencia a florfenicol *floR* usualmente es más estudiado que el gen *cmlA*. Se cree que las 2 razones principales son el aumento del consumo de florfenicol a nivel mundial para la cría de animales y a que esta proteína confiere resistencia a los otros dos anfenicoles (cloranfenicol y tianfenicol). En cambio, el gen de resistencia a cloranfenicol *cmlA* no confiere resistencia a florfenicol y; el cloranfenicol es cada vez menos utilizado debido a los efectos secundarios que produce en humanos y animales. A pesar de sus diferencias, la diseminación de los genes *floR* y *cmlA* están asociadas a la conjugación de plásmidos (transferencia horizontal). El gen *cmlA* se ha identificado en plásmidos grandes (100 kb) con capacidad de transferir la resistencia a cloranfenicol por conjugación (Bischoff et al., 2005).

En los análisis de genotipos se observó que algunos genes se encontraban presentes juntos con mayor frecuencia que otros. Uno de los casos fue los genes *tet(B)*, *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id*, presentados en cepas portadoras de *cmlA*; los 3 primeros genes han sido encontrados en plásmidos móviles y conjugativos aislados de *E. coli* en Costa Rica (Mendoza-Guido et al., 2024). También se han identificado plásmidos del grupo IncII (90-120 kb) portando juntos los genes *tet(A)* y *cmlA* y plásmidos del grupo IncFIC (240 kb) que portan juntos los genes detectados *tet(A)*, *cmlA*, *floR*, *aph(3'')-Ia* y *aph(6)-Id* (Poirel et al., 2018). Esto es indicativo

de la posible presencia de plásmidos móviles o conjugativos con múltiples resistencias entre los aislados.

La detección de genes de resistencia a macrólidos no se realizó debido a que las referencias consultadas difieren entre la resistencia intrínseca o no de *E. coli* a esta familia de antibióticos, y en especial a la eritromicina. Se ha descrito que *E. coli* tiene impermeabilidad a la eritromicina por lo que presenta resistencia natural a este antibiótico (Reygaert, 2018), aunque, algunos artículos clasifican a cepas de *E. coli* como resistentes utilizando métodos como difusión en disco (Kirby Bauer). Ciertamente, se ha demostrado que *E. coli* es un reservorio para genes de resistencia a macrólidos, incluyendo la familia de metiltransferasas *erm*, esterasas *ere*, fosfotransferasas *mph*, bombas de eflujo como *mef(A)* y *msr(A)* (Phuc Nguyen et al., 2009).

Una de las teorías que podrían explicar la abundancia de aislados resistentes sería la proximidad de los sitios de muestreo a las zonas costeras y la contaminación fecal. Investigaciones indican que las zonas costeras tienen mayor abundancia y dominancia de resistencias a los aminoglucósidos, en comparación con otras familias como cloranfenicol y tetraciclina (Zhang, Zhao, et al., 2023). Esto se debe a que las comunidades bacterianas de las costas se encuentran bajo constante presión humana por la descarga de aguas residuales y el arrastre de contaminantes por la escorrentía, que resulta en la exposición a los antibióticos y son detonantes de intercambios de genes de resistencia (Hagan, 2024). Estos hallazgos coinciden con el aislamiento de las bacterias resistentes a los aminoglucósidos en este estudio, pero no descarta la contribución de la contaminación fecal, ya que, esta se correlaciona con la diseminación de bacterias resistentes en los ríos, donde, las zonas de mayor contaminación fecal son las que tienen influencia en la acumulación de genes de resistencia (Schachner-Groehs et al., 2024).

Las aguas residuales también son fuente de Enterobacteriáceas resistentes a distintas familias de antibióticos, siendo los β -lactámicos, tetraciclinas y aminoglucósidos los más frecuentes (Fouz et al., 2020). Están asociadas a la transmisión de resistencias al ambiente, ya que, las plantas de tratamiento de aguas residuales tienen poco impacto en la reducción de genes de resistencia, por lo que, las aguas tratadas pueden diseminar las resistencias entre las comunidades del ambiente. Aunque esto no se ha demostrado para todos los genes, algunos genes de estudio como *tet(A)*, el gen de resistencia a tetraciclina más distribuido entre las poblaciones de *E. coli*, no es reducido en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Bojar et al., 2021; Hubeny et al., 2019; Park et al., 2024).

4.3. Metiltransferasas del ARNr

Los genes codificantes para metiltransferasas del ARN ribosomal 16S (16S-RMTasas) siguen siendo los factores más importantes en las resistencias a los aminoglucósidos a nivel global, debido al alto nivel de resistencia que confieren a la mayoría de los aminoglucósidos, incluyendo la plazomicina, un antibiótico de último recurso (Delgado-Blas et al., 2023).

A la fecha se han reportado 12 16S-RMTasas y algunas variantes de éstas: ArmA, RmtA, RmtB (RmtB1, RmtB2, RmtB3, RmtB4), RmtC, RmtD (RmtD1, RmtD2, RmtD3), RmtE

(RmtE1, RmtE2, RmtE3), RmtF (RmtF1, RmtF2), RmtG, RmtH, NpmA, NpmB (NpmB1, NpmB2) y NpmC (Matamoros et al., 2024; W. Yang & Hu, 2022). Todas estas enzimas son codificadas por genes frecuentemente localizados en plásmidos transferibles y/o elementos genéticos móviles como integrones y transposones. Más preocupante aún, los genes codificantes de estas enzimas tienen un amplio rango de huéspedes, lo cual facilita la dispersión de las resistencias y aumenta el riesgo de panresistencias (resistencia de un microorganismo a todos los fármacos de todas las clases) (W. Yang & Hu, 2022).

El gen codificante para la 16S-RMTasa ArmA ha sido uno de los más prevalentes en el mundo y su prevalencia se encuentra en aumento. Los genes de las 16S-RMTasas RmtB y NpmA son menos prevalentes que ArmA, pero se encuentran emergiendo entre cepas resistentes. Todas estas 16S-RMTasas se han identificado en diferentes bacterias Gram-negativas de importancia médica como *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* (Sellera et al., 2023). Por estas razones y, además, porque estas proteínas habían sido previamente purificadas, se había verificado su actividad metilasa *in vitro* y se había resuelto la estructura cristalográfica de las 3 proteínas ArmA, RmtB y NpmA (Schmitt et al., 2009; Zelinskaya et al., 2011), estas proteínas fueron de interés en esta investigación.

Otro factor importante en la resistencia a los antibióticos es la metiltransferasa del ARN ribosomal 23S (23S-RMTasa) ErmC. Esta proteína, al igual que otras de la familia Erm, confiere resistencia a distintas clases de antibióticos como macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B. Los genes *erm* que codifican estas proteínas se encuentran localizados en elementos genéticos móviles como transposones y en plásmidos conjugativos (de alto y bajo número de copias). La transmisión de este gen en microorganismos patógenos limita la aplicación de antibióticos tradicionales como eritromicina y aumenta el riesgo de fallo terapéutico debido a su aparición en bacterias multirresistentes de prioridad crítica (Miklasińska-Majdanik, 2021). Al igual que las 16S-RMTasas, la proteína ErmC había sido previamente purificada, se había comprobado su actividad enzimática y resuelto su estructura cristalográfica (Bussiere et al., 1998; Schluckebier et al., 1999), por lo que, también fue objeto de interés en esta investigación.

A pesar de que no se detectaron genes codificantes para metiltransferasas del ARN ribosomal 16S (16S-RMTasas) entre los aislados del río Juan Díaz y la PTAR, considerando la cantidad de reportes de los distintos genes, su importancia clínica e información adicional sobre la purificación de las proteínas, ensayos de actividad enzimática (ensayos de metilación) y resolución de las estructuras cristalográficas, se seleccionaron las 16S-RMTasas ArmA, RmtB y NpmA y la 23S-RMTasa ErmC como factores de resistencia de interés para la identificación de aptámeros con capacidad de inhibir la actividad transferasa de estas proteínas y devolverles la actividad antimicrobiana a los antibióticos de la familia de los aminoglucósidos.

4.4. Aislamiento de aptámeros con afinidad a los factores de resistencia y pruebas funcionales para determinar su capacidad de unión e inhibición del fenotipo de resistencia

Mientras que en la metodología tradicional, utilizando proteínas inmovilizadas para la selección de aptámeros de ARN, la muestra es enriquecida mediante la amplificación por RT-PCR y transcripción *in vitro* de los aptámeros durante cada ciclo (In et al., 2017; Sánchez-Luque et al., 2014), la metodología utilizada en este estudio no involucró los pasos de amplificación y transcripción *in vitro*, lo cual no había sido descrito anteriormente en la literatura consultada. Así, mediante sucesivos pasos de: (i) incubación de la proteína recombinante inmovilizada con la librería de aptámeros, (ii) recuperación de los aptámeros unidos, (iii) desnaturalización de la proteína e (iv) incubación con proteína fresca, se logró la captura de aptámeros de ARN con afinidad a las proteínas diana ArmA, RmtB y NpmA. A diferencia de la metodología tradicional, la modificación propuesta no requiere el uso de enzimas de alta fidelidad para preservar las secuencias de los aptámeros, ya que no se realizan repetidas rondas de amplificación y transcripción (Kohlberger & Gadermaier, 2022).

Durante la optimización, se observó que los aptámeros con baja afinidad por las dianas se podían eliminar a partir de la 3er ciclo de SELEX, siendo 5 ciclos suficientes para obtener aptámeros con afinidad por las proteínas dianas. En otras publicaciones, el número de ciclos aumenta hasta 14 (Sánchez-Luque et al., 2014), aunque se estima que 7 – 8 ciclos representan el fin de la selección (El-Husseini et al., 2022). Aunque estos ensayos están orientados a la selección de aptámeros mediante ciclos de amplificación y enfrentamiento con los blancos, queda pendiente comprobar si el aumento de ciclos representa alguna mejora en la selección de aptámeros con la metodología realizada.

La inserción de dianas de restricción en las secuencias del aptámero aumentó el número de aptámeros clonados mediante restricción y ligación, sin alterar la secuencia interna de los aptámeros. Esta modificación fue muy útil, ya que, comúnmente se usan vectores con extremos romos [e.g. pGEM-T (Sánchez-Luque et al., 2014), topoTA (Pileur et al., 2003)] para clonar los aptámeros seleccionados mediante ligación y, considerando los resultados obtenidos, este tipo de clonaje es muy ineficiente debido al tamaño tan pequeño de los fragmentos (<100 bp); además, la ligación de extremos cohesivos es 10 – 100 veces más eficiente que la ligación de extremos romos.

El clonaje en el vector pBSMrnaStrp y posterior secuenciación permitió la identificación de las secuencias de aptámeros. Este vector fue desarrollado específicamente para la expresión de ARN utilizando un promotor fuerte y estable en *E. coli* (Ponchon & Dardel, 2007), por lo que, no solo resultó ser útil para la identificación de los aptámeros sino que fue ideal para la expresión *in vivo* de los aptámeros, demostrado con los ensayos de expresión en los resultados (Figura 53). Esta innovación resolvió uno de los principales inconvenientes en el uso de los aptámeros: la captación de los aptámeros dentro de las células; y es que, está demostrado que para la inhibición *in vivo*, los aptámeros deben alcanzar su blanco intracelular en un tiempo determinado y así evitar su degradación (Wang et al., 2019).

Las secuencias de las regiones aleatorias de los aptámeros identificados para una misma diana no mostraban homología. Este fenómeno ha sido estudiado anteriormente y se ha descrito que los aptámeros pueden tener interacción con diferentes ligandos de la misma diana y/o que, a pesar de las diferencias entre las estructuras primarias, estos pueden compartir similitudes en sus estructuras secundarias o tridimensionales e incluso pueden tener afinidad similar (Dey & Szczepanski, 2020; Ilgu et al., 2019).

A pesar de que se presentó una solución para la expresión *in vivo* de los aptámeros, no fue posible coexpresar los aptámeros junto a los factores de resistencia utilizando el vector pGDP. Si bien, fue posible obtener células dobles transformantes coexpresando los aptámeros y proteínas, estas células no eran estables. El fracaso de este ensayo se le atribuye a la incompatibilidad de ambos vectores: ambos contenían el mismo origen de replicación, por lo que, se cree que ambos vectores competían por el mismo mecanismo de replicación durante la división celular (Sathiamoorthy & Shin, 2012). Este desacierto permitió la mejora metodológica mediante la creación del vector pARC, compatible con el vector pBSMrnaStrp, puesto que ambos tienen distintos orígenes de replicación y, por tanto, pertenecen a diferentes grupos de incompatibilidad, por lo que se pueden mantener conjuntamente en la progenie bacteriana a lo largo del tiempo.

La creación del vector pARC permitió la expresión de las proteínas y alcanzar un nivel de resistencia similar al obtenido con el pGDP. Además, permitió la obtención de células dobles transformantes estables cotransformadas con el vector pBSMrnaStrp. Al incluir un marcador de selección diferente (CmR, que proporciona resistencia a cloranfenicol) al del pBSMrnaStrp (AmpR, que proporciona resistencia a ampicilina), se redujo el tiempo y las verificaciones necesarias para confirmar la presencia de ambos vectores en la misma célula. Además, ofreció la posibilidad de cambiar los promotores mediante clonaje por restricción.

Aunque no se detectaron aptámeros con capacidad de inhibir ArmA, esto no indica el fracaso del método. En investigaciones publicadas se ha advertido que solo un bajo número de aptámeros son capaces de inhibir las proteínas dianas, en comparación con el número de aptámeros seleccionados. Por ejemplo, un estudio identificó 2 aptámeros con actividad inhibitoria contra la ARNasa Humana H1 de un total de 37 aptámeros seleccionados (Pileur et al., 2003). En este estudio solo se evaluaron 24 aptámeros seleccionados y aún se cuenta con otras librerías de aptámeros que podrían ser probadas, además de los aptámeros con afinidad por las otras 2 proteínas, RmtB y NpmA. Además, considerando que la expresión de ARN *in vivo* es muy controlada en la célula, se tienen en mente otras estrategias para evitar la posible degradación de los aptámeros por acción de las ARNasas. Una de estas estrategias involucra la modificación de los aptámeros para que evadan las ARNasas mediante el *scaffold* también provisto por el vector pBSMrnaStrp, para lo que solo se requeriría el clonaje de los aptámeros un sitio diferente del vector. Esta idea se basa en que, anteriormente se ha demostrado que los aptámeros modificados en los extremos 5' y 3' con tallos-bucle estables exhiben actividad inhibitoria en comparación con su versión no modificada (Sánchez-Luque et al., 2014).

4.5. Interacción ARN-proteína

El uso de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados es uno de los métodos más utilizados para la purificación de proteínas recombinantes. Sin embargo, ante condiciones de estrés, se presentan proteínas nativas de *E. coli* que exhiben gran afinidad por cationes divalentes como níquel, cobalto o cobre. Esto se debe a la naturaleza de estas proteínas, ya que, algunas contienen grupos de residuos de histidinas que interaccionan con los metales. Además, se ha demostrado que algunas de estas proteínas tienen interacciones con diferentes tipos de ARN, entre ellas: el Factor de integración del huésped (Hfq), proteínas regulatorias ribosomales (S15) y la formiltransferasa (YfbG) interaccionan con ARN (Bolanos-Garcia & Davies, 2006).

Los resultados de la interacción *in vivo* de las proteínas ArmA y RmtB con los aptámeros de ARN expresados no fue concluyente. Al intentar purificar los complejos ARN-proteína a partir del extracto celular utilizando resinas magnéticas, también se co-purificó una proteína contaminante que interactuaba con ácidos nucleicos, según lo observado en las tinciones con GelGreen y azul de Coomassie. Estas proteínas contaminantes no se pudieron observar en las electroforesis nativas al utilizar las proteínas que habían sido purificadas secuencialmente por cromatografía de afinidad y exclusión molecular, lo que demuestra que el método utilizado para la purificación de los complejos debe incluir pasos adicionales, aunque, se opta por la realización de ensayos de retardo en gel para demostrar la interacción RNA-proteína y determinar la afinidad de los aptámeros por la proteína. La identidad del contaminante se desconoce, pero al haberse observado en los ensayos de ambas proteínas, se deduce que puede ser una proteína nativa de *E. coli* como las anteriormente mencionadas.

Capítulo 5. Conclusión

Se determinó la prevalencia de factores de resistencia a los antibióticos dirigidos al ribosoma en aislados de *E. coli*. Tanto en el río Juan Díaz como en las aguas residuales influentes a la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la Ciudad, se encontró que los factores de resistencia más prevalentes eran bombas de eflujo que conferían resistencia a las tetraciclinas y cloranfenicol, detectándose con mayor frecuencia los genes *tet(A)* y *floR*, respectivamente. Además, se detectó la presencia de genes que codifican para fosfotransferasas y adeniltransferasas de aminoglucósidos, siendo *strA-strB* y *ant(3'')-Ia* los más prevalentes, respectivamente.

Se definieron las condiciones de clonaje, sobreexpresión de 4 factores de resistencia ribosomal entre los que se encuentran las metiltransferasas del ARN ribosomal 16S ArmA, RmtB y NpmA; y, la metiltransferasa del ARN ribosomal 23S ErmC. Se utilizó el sistema pET28 como vector de clonaje, para la sobreexpresión de los factores de resistencia recombinantes en células de *E. coli*. Además, fue posible la purificación de las proteínas ArmA, RmtB y NpmA con gran pureza y concentración, mediante técnicas de cromatografía de afinidad y de exclusión molecular.

Se analizaron aptámeros de ARN con capacidad de unión a las proteínas dianas ArmA, NpmA y RmtB. Estos fueron obtenidos a partir de la modificación de la tecnología SELEX, utilizando proteínas inmovilizadas para la selección de aptámeros y mediante la detección por RT-PCR de los aptámeros con afinidad por las proteínas dianas. Además, se identificaron los aptámeros mediante el clonaje de los aptámeros en vectores plasmídicos y posterior secuenciación.

Finalmente, se establecieron condiciones para la determinación de la afinidad de los aptámeros a las proteínas dianas y se evaluaron métodos para la selección de aptámeros con actividad inhibitoria. Sin embargo, queda pendiente la identificación de aptámeros con actividad inhibitoria.

Capítulo 6. Recomendaciones

Atendiendo a algunos resultados obtenidos se recomienda:

1. Establecer programas de monitoreo en ambos puntos de muestreo con el fin de registrar la ocurrencia de los genes de resistencia, estudiar patrones estacionales y garantizar una vigilancia epidemiológicas.
2. Utilizar otros métodos moleculares para la detección y/o identificación de los genes de resistencia a los antibióticos como secuenciación de genomas o secuenciación masiva, haciendo énfasis en los grupos de antibióticos como los aminoglucósidos.
3. Continuar los estudios de los factores de resistencia e identificar aptámeros con actividad inhibitoria.
4. Continuar los ensayos de SELEX con la metodología propuesta para la optimización del número ciclos de selección, tamaño de las librerías de aptámeros y otras variables que surjan.
5. Continuar con las investigaciones en el campo de la interacción de los aptámeros y proteínas dianas.

Capítulo 7. Referencias

- Adachi, T., & Nakamura, Y. (2019). Aptamers: A Review of Their Chemical Properties and Modifications for Therapeutic Application. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(23). <https://doi.org/10.3390/molecules24234229>
- Adesoji, A. T., Ogunjobi, A. A., Olatoye, I. O., & Call, D. R. (2015). Prevalence of tetracycline resistance genes among multi-drug resistant bacteria from selected water distribution systems in southwestern Nigeria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14, 35. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0093-1>
- Aleksandrova, E. V., Wu, K. J. Y., Tresco, B. I. C., Syroegin, E. A., Killeavy, E. E., Balasanyants, S. M., Svetlov, M. S., Gregory, S. T., Atkinson, G. C., Myers, A. G., & Polikanov, Y. S. (2024). Structural basis of Cfr-mediated antimicrobial resistance and mechanisms to evade it. *Nature Chemical Biology*, 20(7), 867–876. <https://doi.org/10.1038/s41589-023-01525-w>
- Antony, A. C., Paul, M. K., Silvester, R., Aneesa, P. A., Suresh, K., Divya, P. S., Paul, S., Fathima, P. A., & Abdulla, M. H. (2016). Comparative evaluation of EMB agar and hicrome E. coli agar for differentiation of green metallic sheen producing non E. Coli and typical E. Coli colonies from food and environmental samples. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(4), 2863–2870. <https://doi.org/10.22207/JPAM.10.4.48>
- Bassetti, M., Vena, A., Giacobbe, D. R., & Castaldo, N. (2021). Management of Infections Caused by Multidrug-resistant Gram-negative Pathogens: Recent Advances and Future Directions. *Archives of Medical Research*, 52(8), 817–827. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2021.09.002>
- Belaynehe, K. M., Shin, S. W., Hong-Tae, P., & Yoo, H. S. (2017). Occurrence of aminoglycoside-modifying enzymes among isolates of Escherichia coli exhibiting high levels of aminoglycoside resistance isolated from Korean cattle farms. *FEMS Microbiology Letters*, 364(14), fnx129. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx129>
- Bischoff, K. M., White, D. G., Hume, M. E., Poole, T. L., & Nisbet, D. J. (2005). The chloramphenicol resistance gene cmlA is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine Escherichia coli. *FEMS Microbiology Letters*, 243(1), 285–291. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.017>
- Bjerregaard, N., Andreasen, P. A., & Dupont, D. M. (2016). Expected and unexpected features of protein-binding RNA aptamers. *WIREs RNA*, 7(6), 744–757. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wrna.1360>
- Bodendoerfer, E., Marchesi, M., Imkamp, F., Courvalin, P., Böttger, E. C., & Mancini, S. (2020). Co-occurrence of aminoglycoside and β -lactam resistance mechanisms in aminoglycoside- non-susceptible Escherichia coli isolated in the Zurich area, Switzerland. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(1), 106019. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106019>
- Bojar, B., Sheridan, J., Beattie, R., Cahak, C., Liedhegner, E., Munoz-Price, L. S., Hristova, K. R., & Skwor, T. (2021). Antibiotic resistance patterns of Escherichia coli isolates

- from the clinic through the wastewater pathway. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 238, 113863. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113863>
- Bolanos-Garcia, V. M., & Davies, O. R. (2006). Structural analysis and classification of native proteins from E. coli commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(9), 1304–1313. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.027>
- Bussiere, D. E., Muchmore, S. W., Dealwis, C. G., Schluckebier, G., Nienaber, V. L., Edalji, R. P., Walter, K. A., Lador, U. S., Holzman, T. F., & Abad-Zapatero, C. (1998). Crystal structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria. *Biochemistry*, 37(20), 7103–7112. <https://doi.org/10.1021/bi973113c>
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Chalmers, G., Kozak, G. K., Hillyer, E., Reid-Smith, R. J., & Boerlin, P. (2010). Low minimum inhibitory concentrations associated with the tetracycline-resistance gene tet(C) in Escherichia coli. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, 74(2), 145–148.
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 65(2), 232-60 ; second page, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
- CLSI. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (30th ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cox, G., Sieron, A., King, A. M., De Pascale, G., Pawlowski, A. C., Koteva, K., & Wright, G. D. (2017). A Common Platform for Antibiotic Dereplication and Adjuvant Discovery. *Cell Chemical Biology*, 24(1), 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.11.011>
- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
- Crowe-McAuliffe, C., Murina, V., Turnbull, K. J., Kasari, M., Mohamad, M., Polte, C., Takada, H., Vaitkevicius, K., Johansson, J., Ignatova, Z., Atkinson, G. C., O'Neill, A. J., Hauryliuk, V., & Wilson, D. N. (2021). Structural basis of ABCF-mediated resistance to pleuromutilin, lincosamide, and streptogramin A antibiotics in Gram-positive pathogens. *Nature Communications*, 12(1), 3577. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23753-1>
- Csuros, M., & Csuros, C. (1999). *Microbiological Examination of Water and Wastewater*. CRC Press.
- Delgado-Blas, J. F., Ovejero, C. M., David, S., Serna, C., Pulido-Vadillo, M., Montero, N., Aanensen, D. M., Abadia-Patiño, L., & Gonzalez-Zorn, B. (2023). Global scenario of

- the RmtE pan-aminoglycoside-resistance mechanism: emergence of the rmtE4 gene in South America associated with a hospital-related IncL plasmid. *Microbial Genomics*, 9(3). <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mgen.0.000946>
- Dey, S., & Szczepanski, J. T. (2020). In vitro selection of l-DNA aptamers that bind a structured d-RNA molecule. *Nucleic Acids Research*, 48(4), 1669–1680. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1236>
- Domínguez, D. C., Chacón, L. M., & Wallace, D. (2021). Anthropogenic Activities and the Problem of Antibiotic Resistance in Latin America: A Water Issue. *Water*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/w13192693>
- Dönhöfer, A., Franckenberg, S., Wickles, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., & Wilson, D. N. (2012). Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42), 16900–16905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208037109>
- Du, Z., Wang, M., Cui, G., Zu, X., Zhao, Z., & Xue, Y. (2020). The prevalence of amphenicol resistance in Escherichia coli isolated from pigs in mainland China from 2000 to 2018: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 15(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228388>
- Duclair, S., Gautam, A., Ellington, A., & Prasad, V. R. (2015). High-affinity RNA Aptamers Against the HIV-1 Protease Inhibit Both in Vitro Protease Activity and Late Events of Viral Replication. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4(2), e228. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.1>
- Egorov, A. M., Ulyashova, M. M., & Rubtsova, M. Y. (2018). Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance. *Acta Naturae*, 10(4), 33–48.
- El-Husseini, D. M., Sayour, A. E., Melzer, F., Mohamed, M. F., Neubauer, H., & Tammam, R. H. (2022). Generation and Selection of Specific Aptamers Targeting Brucella Species through an Enhanced Cell-SELEX Methodology. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/ijms23116131>
- Escolà-Vergé, L., Los-Arcos, I., & Almirante, B. (2020). New antibiotics for the treatment of infections by multidrug-resistant microorganisms. *Medicina Clínica (English Edition)*, 154(9), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2019.11.005>
- Espinoza, L. L., Huamán, D. C., Cueva, C. R., Gonzales, C. D., León, Y. I., Espejo, T. S., Monge, G. M., Alcántara, R. R., & Hernández, L. M. (2023). Genomic analysis of multidrug-resistant Escherichia coli strains carrying the mcr-1 gene recovered from pigs in Lima-Peru. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 99, 102019. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102019>
- EUCAST. (2024). *eucast: Guidance Documents*. <https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments>
- FAO, OIE, OMS, & ONU. (2021). *La resistencia a los antimicrobianos y el Marco de Cooperación de las Naciones Unidas para el Desarrollo Sostenible: orientaciones para los equipos de las Naciones Unidas en los países*.

- Fernández-Martínez, M., Miró, E., Ortega, A., Bou, G., González-López, J. J., Oliver, A., Pascual, A., Cercenado, E., Oteo, J., Martínez-Martínez, L., & Navarro, F. (2015). Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to amoxicillin/clavulanic acid isolated in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(2), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.008>
- Fouz, N., Pangesti, K. N. A., Yasir, M., Al-Malki, A. L., Azhar, E. I., Hill-Cawthorne, G. A., & Abd El Ghany, M. (2020). The Contribution of Wastewater to the Transmission of Antimicrobial Resistance in the Environment: Implications of Mass Gathering Settings. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5010033>
- Fyfe, C., Grossman, T. H., Kerstein, K., & Sutcliffe, J. (2016). Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025395>
- Garcias, B., Martin, M., & Darwich, L. (2024). Characterization of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Diarrheic and Healthy Weaned Pigs in Catalonia. In *Animals* (Vol. 14, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/ani14030487>
- Gasparrini, A. J., Markley, J. L., Kumar, H., Wang, B., Fang, L., Irum, S., Symister, C. T., Wallace, M., Burnham, C.-A. D., Andleeb, S., Tolia, N. H., Wencewicz, T. A., & Dantas, G. (2020). Tetracycline-inactivating enzymes from environmental, human commensal, and pathogenic bacteria cause broad-spectrum tetracycline resistance. *Communications Biology*, 3(1), 241. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0966-5>
- Gaurav, A., Bakht, P., Saini, M., Pandey, S., & Pathania, R. (2023). Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. *Microbiology (Reading, England)*, 169(5). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001333>
- Grenni, P. (2022). Antimicrobial Resistance in Rivers: A Review of the Genes Detected and New Challenges. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(3), 687–714. <https://doi.org/10.1002/etc.5289>
- Hagan, J. (2024). Mapping the spread of antibiotic resistance genes in the coastal microbiome. *BioTechniques*, 76(9), 411–414. <https://doi.org/10.1080/07366205.2024.2416379>
- Hoinka, J., Berezhnoy, A., Sauna, Z. E., Gilboa, E., & Przytycka, T. M. (2014). AptCluster - A Method to Cluster HT-SELEX Aptamer Pools and Lessons from its Application. *Research in Computational Molecular Biology: ... Annual International Conference, RECOMB ...: Proceedings. RECOMB (Conference: 2005-)*, 8394, 115–128. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05269-4_9
- Horakova, K., Mlejnkova, H., & Mlejnek, P. (2008). Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: Cytochrome bd complex, lactose permease, β -d-glucuronidase, and β -d-galactosidase. *Journal of Applied Microbiology*, 105(4), 970–976. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03838.x>

- Hubeny, J., Buta, M., Zieliński, W., Harnisz, M., Korzeniewska, E., Nowrotek, M., & Płaza, G. (2019). The Prevalence of tet(A) and tet(M) Tetracycline Resistance Genes in Municipal Wastewater. *Journal of Ecological Engineering*, 20(10), 1–6. <https://doi.org/10.12911/22998993/112714>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Ilgü, M., Yan, S., Khounlo, R. M., Lamm, M. H., & Nilsen-Hamilton, M. (2019). Common Secondary and Tertiary Structural Features of Aptamer–Ligand Interaction Shared by RNA Aptamers with Different Primary Sequences. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 24). <https://doi.org/10.3390/molecules24244535>
- In, J., Seung, J., & Han, R. (2017). Development of RNA aptamer that inhibits methyltransferase activity of dengue virus. *Biotechnology Letters*. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2462-7>
- Inuwa, A. B., Mahmood, Q., Iqbal, J., Widemann, E., Shafiq, S., Irshad, M., Irshad, U., Iqbal, A., Hafeez, F., & Nazir, R. (2022). Removal of Antibiotic Resistance Genes, Class 1 Integrase Gene and Escherichia coli Indicator Gene in a Microalgae-Based Wastewater Treatment System. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111531>
- Islam, M. S., Hossain, M. J., Sobur, M. A., Punom, S. A., Rahman, A. M. M. T., & Rahman, M. T. (2023). A Systematic Review on the Occurrence of Antimicrobial-Resistant Escherichia coli in Poultry and Poultry Environments in Bangladesh between 2010 and 2021. *BioMed Research International*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/2425564>
- Kavita, K., & Breaker, R. R. (2023). Discovering riboswitches: the past and the future. *Trends in Biochemical Sciences*, 48(2), 119–141. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.08.009>
- Keefe, A. D., Pai, S., & Ellington, A. (2010). Aptamers as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(7), 537–550. <https://doi.org/10.1038/nrd3141>
- Khan, S., Hussain, A., Fahimi, H., Aliakbari, F., Haj Bloukh, S., Edis, Z., Mahdi Nejadi Babadaei, M., Izadi, Z., Shiri Varnamkhasti, B., Jahanshahi, F., Lin, Y., Hao, X., Hasan Khan, R., Rasti, B., Vaghar-Lahijani, G., Hua, L., Derakhshankhah, H., Sharifi, M., & Falahati, M. (2022). A review on the therapeutic applications of aptamers and aptamer-conjugated nanoparticles in cancer, inflammatory and viral diseases. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(2), 103626. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103626>
- Kim, H.-S., Kim, Y.-J., Chon, J.-W., Kim, D.-H., Kim, K.-Y., & Seo, K.-H. (2016). Citrobacter braakii: A Major Cause of False-Positive Results on MacConkey and Levine's Eosin Methylene Blue Selective Agars Used for the Isolation of Escherichia Coli from Fresh Vegetable Samples. *Journal of Food Safety*, 36(1), 33–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfs.12210>
- Koch, N., Islam, N. F., Sonowal, S., Prasad, R., & Sarma, H. (2021). Environmental antibiotics and resistance genes as emerging contaminants: Methods of detection and

- bioremediation. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100027. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100027>
- Kohlberger, M., & Gadermaier, G. (2022). SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(5), 1771–1792. <https://doi.org/10.1002/bab.2244>
- Koulenti, D., Song, A., Ellingboe, A., Abdul-Aziz, M. H., Harris, P., Gavey, E., & Lipman, J. (2019). Infections by multidrug-resistant Gram-negative Bacteria: What's new in our arsenal and what's in the pipeline? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(3), 211–224. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.10.011>
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>
- Kuo, H. C., Wei, H. W., Chang, C. D., Chou, C. C., Tu, C., Liao, J. W., & Chang, S. K. (2009). Molecular detection of florfenicol and chloramphenicol resistance among *Escherichia coli* isolates from healthy pigs during 2003 to 2007. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17(3). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2608>
- Lambert, T. (2012). Antibiotics that affect the ribosome. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 31(1), 57–64. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2095>
- Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Lasso, M. (2024). *Industria avícola panameña sigue creciendo en producción de pollo y huevo, asegura Anavip*. La Estrella de Panamá. <https://www.laestrella.com.pa/economia/industria-avicola-panamena-sigue-creciendo-en-produccion-de-pollo-y-huevo-asegura-anavip-MA6266358#:~:text=La industria avicola panameña sigue,per cápita de 188 unidades>.
- Laughlin, Z. T., & Conn, G. L. (2022). Tuberactinomycin antibiotics: Biosynthesis, antimycobacterial action, and mechanisms of resistance. *Frontiers in Microbiology*, 13, 961921. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.961921>
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(12), S122–S129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>
- Li, P., Zhu, T., Zhou, D., Lu, W., Liu, H., Sun, Z., Ying, J., Lu, J., Lin, X., Li, K., Ying, J., Bao, Q., & Xu, T. (2020). Analysis of Resistance to Florfenicol and the Related Mechanism of Dissemination in Different Animal-Derived Bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(2), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00369>
- Li, W., & Zhang, G. (2022). Detection and various environmental factors of antibiotic resistance gene horizontal transfer. In *Environmental Research* (Vol. 212, p. 113267). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113267>
- Liao, C. Y., Balasubramanian, B., Peng, J. J., Tao, S. R., Liu, W. C., & Ma, Y. (2021). Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* From Aquaculture Farms and Their

- Environment in Zhanjiang, China. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.806653>
- Lin, J., Zhou, D., Steitz, T. A., Polikanov, Y. S., & Gagnon, M. G. (2018). Ribosome-Targeting Antibiotics: Modes of Action, Mechanisms of Resistance, and Implications for Drug Design. *Annual Review of Biochemistry*, 87(1), 451–478. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011942>
- Livermore, D. M., Winstanley, T. G., & Shannon, K. P. (2001). Interpretative reading: Recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(SUPPL. 1), 87–102. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.87
- Lund, D., Coertze, R. D., Parras-Moltó, M., Berglund, F., Flach, C.-F., Johnning, A., Larsson, D. G. J., & Kristiansson, E. (2023). Extensive screening reveals previously undiscovered aminoglycoside resistance genes in human pathogens. *Communications Biology*, 6(1), 812. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05174-6>
- Ma, Z., Lee, S., & Casey Jeong, K. (2019). Mitigating antibiotic resistance at the livestock-environment interface: A review. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(11), 1683–1692. <https://doi.org/10.4014/jmb.1907.07011>
- Malicki, S., Ksiazek, M., Majewski, P., Pecak, A., Mydel, P., Grudnik, P., & Dubin, G. (2019). Development of a novel, high-affinity ssDNA trypsin inhibitor. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 638–643. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1569648>
- Malicki, S., Książek, M., Sochaj Gregorczyk, A., Kamińska, M., Golda, A., Chruścicka, B., Mizgalska, D., Potempa, J., Marti, H.-P., Koziel, J., Wieczorek, M., Pieczykolan, J., Mydel, P., & Dubin, G. (2023). Identification and characterization of aptameric inhibitors of human neutrophil elastase. *The Journal of Biological Chemistry*, 299(8), 104889. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104889>
- Matamoros, B. R., Serna, C., Wedel, E., Montero, N., Kirpekar, F., & Gonzalez-Zorn, B. (2024). NpmC, a novel A1408 16S rRNA methyltransferase in the gut of humans and animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 107382. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2024.107382>
- Matzov, D., Bashan, A., & Yonath, A. (2017). A bright future for antibiotics? *Annual Review of Biochemistry*, 86, 567–583. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044617>
- Mendoza-Guido, B., Barrantes, K., Rodríguez, C., Rojas-Jimenez, K., & Arias-Andres, M. (2024). The Impact of Urban Pollution on Plasmid-Mediated Resistance Acquisition in Enterobacteria from a Tropical River. In *Antibiotics* (Vol. 13, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics13111089>
- Mikłasińska-Majdanik, M. (2021). Mechanisms of Resistance to Macrolide Antibiotics among *Staphylococcus aureus*. In *Antibiotics* (Vol. 10, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111406>

- Mondragón, E., & Maher, L. J. 3rd. (2015). RNA aptamer inhibitors of a restriction endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 43(15), 7544–7555. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv702>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Nasrollahian, S., Graham, J. P., & Halaji, M. (2024). A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of E. coli. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1387497>
- Naveed, M., Chaudhry, Z., Bukhari, S. A., Meer, B., & Ashraf, H. (2019). Antibiotics resistance mechanism. In *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment: Volume 1 in the Advances in Environmental Pollution Research Series* (pp. 292–312). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818882-8.00019-X>
- Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, 15(4), 209–215. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0363>
- Ni, S., Zhuo, Z., Pan, Y., Yu, Y., Li, F., Liu, J., Wang, L., Wu, X., Li, D., Wan, Y., Zhang, L., Yang, Z., Zhang, B.-T., Lu, A., & Zhang, G. (2021). Recent Progress in Aptamer Discoveries and Modifications for Therapeutic Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(8), 9500–9519. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c05750>
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 119–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>
- Nimjee, S. M., White, R. R., Becker, R. C., & Sullenger, B. A. (2017). Aptamers as Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57, 61–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558>
- Núñez-Samudio, V., Pimentel-Peralta, G., De La Cruz, A., & Landires, I. (2024). Multidrug-resistant phenotypes of genetically diverse Escherichia coli isolates from healthy domestic cats. *Scientific Reports*, 14(1), 11260. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62037-8>
- Obayiuwana, A., & Ibekwe, A. M. (2020). Antibiotic Resistance Genes Occurrence in Wastewaters from Selected Pharmaceutical Facilities in Nigeria. In *Water* (Vol. 12, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/w12071897>
- Ojkic, N., Serbanescu, D., & Banerjee, S. (2022). Antibiotic Resistance via Bacterial Cell Shape-Shifting. *MBio*, 13(3), e0065922. <https://doi.org/10.1128/mbio.00659-22>
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos*.
- Osterman, I. A., Dontsova, O. A., & Sergiev, P. V. (2020). rRNA Methylation and Antibiotic Resistance. *Biochemistry (Moscow)*, 85(11), 1335–1349. <https://doi.org/10.1134/S000629792011005X>
- Palomino, J., & Pachón, J. (2003). Aminoglucósidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21(2),

- Park, J.-H., Bae, K.-S., Kang, J., Yoon, J.-K., & Lee, S.-H. (2024). Comprehensive Assessment of Multidrug-Resistant and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Wastewater Treatment Plant Effluents. In *Microorganisms* (Vol. 12, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061119>
- Paul, D., Chawla, M., Ahrodia, T., Narendrakumar, L., & Das, B. (2023). Antibiotic Potentiation as a Promising Strategy to Combat Macrolide Resistance in Bacterial Pathogens. In *Antibiotics* (Vol. 12, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12121715>
- Perewari, D. O., Otokunefor, K., & Agbagwa, O. E. (2022). *Tetracycline-Resistant Genes in Escherichia coli from Clinical and Nonclinical Sources in Rivers State, Nigeria*. 2022.
- Phuc Nguyen, M. C., Woerther, P. L., Bouvet, M., Andremont, A., Leclercq, R., & Canu, A. (2009). *Escherichia coli* as reservoir for macrolide resistance genes. *Emerging Infectious Diseases*, 15(10), 1648–1650. <https://doi.org/10.3201/eid1510.090696>
- Pileur, F., Andreola, M. L., Dausse, E., Michel, J., Moreau, S., Yamada, H., Gaidamakov, S. A., Crouch, R. J., Toulmé, J. J., & Cazenave, C. (2003). Selective inhibitory DNA aptamers of the human RNase H1. *Nucleic Acids Research*, 31(19), 5776–5788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg748>
- Planson, A.-G., Sauveplane, V., Dervyn, E., & Jules, M. (2020). Bacterial growth physiology and RNA metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1863(5), 194502. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194502>
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4), ARBA-0026-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>
- Polianciuc, S. I., Gurzău, A. E., Kiss, B., Ștefan, M. G., & Loghin, F. (2020). Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Medicine and Pharmacy Reports*, 93(3), 231–240. <https://doi.org/10.15386/mpr-1742>
- Polikanov, Y. S., Aleksashin, N. A., Beckert, B., & Wilson, D. N. (2018). The Mechanisms of Action of Ribosome-Targeting Peptide Antibiotics. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5. <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-biosciences/articles/10.3389/fmolb.2018.00048>
- Ponchon, L., & Dardel, F. (2007). Recombinant RNA technology: the tRNA scaffold. *Nature Methods*, 4(7), 571–576. <https://doi.org/10.1038/nmeth1058>
- Prabha, S., Gaia, M., Mattia, P., Gabriele, A., Egle, K., Riccardo, P., Alessandra, C., Peter, D., & Luca, G. (2023). Genetic background of neomycin resistance in clinical *Escherichia coli* isolated from Danish pig farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(10), e00559-23. <https://doi.org/10.1128/aem.00559-23>
- Ramírez-Bayard, I. E., Mejía, F., Medina-Sánchez, J. R., Cornejo-Reyes, H., Castillo, M., Querol-Audi, J., & Martínez-Torres, A. O. (2023). Prevalence of Plasmid-Associated

- Tetracycline Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Environmental, Animal and Human Samples in Panama. In *Antibiotics* (Vol. 12, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020280>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 13(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Roberts, M. C., & Schwarz, S. (2009). Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms. In D. L. Mayers (Ed.), *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance* (pp. 183–193). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-180-2_15
- Rodríguez P., M. (2017). *Actividad avícola fue clave en crecimiento del sector agrario*. La Estrella de Panamá. <https://www.laestrella.com.pa/economia/clave-avicola-actividad-crecimiento-LPLE73409>
- Sanchez-Cid, C., Guironnet, A., Keuschnig, C., Wiest, L., Vulliet, E., & Vogel, T. M. (2022). Gentamicin at sub-inhibitory concentrations selects for antibiotic resistance in the environment. *ISME Communications*, 2(1), 29. <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00101-y>
- Sánchez-Luque, F. J., Stich, M., Manrubia, S., Briones, C., & Berzal-Herranz, A. (2014). Efficient HIV-1 inhibition by a 16 nt-long RNA aptamer designed by combining in vitro selection and in silico optimisation strategies. *Scientific Reports*, 4, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep06242>
- Sathiamoorthy, S., & Shin, J. A. (2012). Boundaries of the Origin of Replication: Creation of a pET-28a-Derived Vector with p15A Copy Control Allowing Compatible Coexistence with pET Vectors. *PLOS ONE*, 7(10), e47259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047259>
- Schachner-Groehs, I., Koller, M., Leopold, M., Kolm, C., Linke, R. B., Jakwerth, S., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Kandler, W., Sulyok, M., Vierheilig, J., Toumi, M., Farkas, R., Toth, E., Kittinger, C., Zarfel, G., Farnleitner, A. H., & Kirschner, A. K. T. (2024). Linking antibiotic resistance gene patterns with advanced faecal pollution assessment and environmental key parameters along 2300 km of the Danube River. *Water Research*, 252, 121244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121244>
- Schaenzer, A. J., & Wright, G. D. (2020). Antibiotic Resistance by Enzymatic Modification of Antibiotic Targets. *Trends in Molecular Medicine*, 26(8), 768–782. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.001>
- Schluckebier, G., Zhong, P., Stewart, K. D., Kavanaugh, T. J., & Abad-Zapatero, C. (1999). The 2.2 Å structure of the rRNA methyltransferase ErmC' and its complexes with cofactor and cofactor analogs: Implications for the reaction mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 289(2), 277–291. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2788>

- Schmitt, E., Galimand, M., Panvert, M., Courvalin, P., & Mechulam, Y. (2009). Structural Bases for 16 S rRNA Methylation Catalyzed by ArmA and RmtB Methyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, 388(3), 570–582. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.034>
- Sellera, F. P., Fuentes-Castillo, D., & Furlan, J. P. (2023). One Health Spread of 16S Ribosomal RNA Methyltransferase-Harboring Gram-Negative Bacterial Genomes: An Overview of the Americas. In *Pathogens* (Vol. 12, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/pathogens12091164>
- Shraim, A. S., Abdel Majeed, B. A., Al-Binni, M. A., & Hunaiti, A. (2022). Therapeutic Potential of Aptamer-Protein Interactions. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 5(12), 1211–1227. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.2c00156>
- Tang, B., Ni, J., Lin, J., Sun, Y., Lin, H., Wu, Y., Yang, H., & Yue, M. (2022). Genomic characterization of multidrug-resistance gene cfr in Escherichia coli recovered from food animals in Eastern China. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.999778>
- Townshend, B., Aubry, I., Marcellus, R. C., Gehring, K., & Tremblay, M. L. (2010). An RNA aptamer that selectively inhibits the enzymatic activity of protein tyrosine phosphatase 1B in vitro. *ChemBioChem*, 11(11), 1583–1593. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000208>
- Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- Upmanyu, N., & Malviya, V. N. (2020). Antibiotics: Mechanisms of action and modern challenges. In *Microorganisms for Sustainable Environment and Health* (pp. 367–382). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819001-2.00018-8>
- Vásquez-Jaramillo, L., Cardozo-Herrera, L. K., & Correa Valencia, N. M. D. P. (2023). A systematic review of tetracycline resistance genes in animals and derived products in Latin America and the Caribbean. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 60. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2023.213883>
- Vester, B., & Long, K. (2009). Antibiotic Resistance in Bacteria Caused by Modified Nucleosides in 23S Ribosomal RNA. *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution*.
- Wachino, J. I., Doi, Y., & Arakawa, Y. (2020). Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infectious Disease Clinics of North America*, 34(4), 887–902. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2020.06.002>
- Wang, L., Lee, J. Y., Gao, L., Yin, J., Duan, Y., Jimenez, L. A., Adkins, G. B., Ren, W., Li, L., Fang, J., Wang, Y., Song, J., & Zhong, W. (2019). A DNA aptamer for binding and inhibition of DNA methyltransferase 1. *Nucleic Acids Research*, 47(22), 11527–11537. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1083>

- Wellner, S. M., Alobaidallah, M. S. A., Fei, X., Herrero-Fresno, A., & Olsen, J. E. (2024). Genome-wide identification of fitness-genes in aminoglycoside-resistant *Escherichia coli* during antibiotic stress. *Scientific Reports*, *14*(1), 4163. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54169-8>
- Wencewicz, T. A. (2019). Crossroads of Antibiotic Resistance and Biosynthesis. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 431, Issue 18, pp. 3370–3399). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.033>
- Williams, C. T., Musicha, P., Feasey, N. A., Adams, E. R., & Edwards, T. (2019). ChloS-HRM, a novel assay to identify chloramphenicol-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Malawi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(5), 1212–1217. <https://doi.org/10.1093/jac/dky563>
- Wright, G. D. (1999). Aminoglycoside-modifying enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, *2*(5), 499–503. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00007-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00007-7)
- Wu, Y. X., & Kwon, Y. J. (2016). Aptamers: The “evolution” of SELEX. *Methods*, *106*(2016), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.04.020>
- Yang, L. F., Ling, M., Kacherovsky, N., & Pun, S. H. (2023). Aptamers 101: aptamer discovery and in vitro applications in biosensors and separations. *Chemical Science*, *14*, 4961–4978. <https://doi.org/10.1039/d3sc00439b>
- Yang, W., & Hu, F. (2022). Research Updates of Plasmid-Mediated Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methyltransferase. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070906>
- Yu, T., & Zeng, F. (2024). Chloramphenicol Interferes with 50S Ribosomal Subunit Maturation via Direct and Indirect Mechanisms. *Biomolecules*, *14*(10). <https://doi.org/10.3390/biom14101225>
- Zaman, S., Fitzpatrick, M., Lindahl, L., & Zengel, J. (2007). Novel mutations in ribosomal proteins L4 and L22 that confer erythromycin resistance in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *66*(4), 1039–1050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05975.x>
- Zelinskaya, N., Rankin, C. R., MacMaster, R., Savic, M., & Conn, G. L. (2011). Expression, purification and crystallization of adenosine 1408 aminoglycoside-resistance rRNA methyltransferases for structural studies. *Protein Expression and Purification*, *75*(1), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.07.005>
- Zhang, Y., Zhang, N., Wang, M., Luo, M., Peng, Y., Li, Z., Xu, J., Ou, M., Kan, B., Li, X., & Lu, X. (2023). The prevalence and distribution of aminoglycoside resistance genes. *Biosafety and Health*, *5*(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2023.01.001>
- Zhang, Y., Zhao, Z., Xu, H., Wang, L., Liu, R., & Jia, X. (2023). Fate of antibiotic resistance genes and bacteria in a coupled water-processing system with wastewater treatment plants and constructed wetlands in coastal eco-industrial parks. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *252*, 114606. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114606>

- Zhou, H., Zhang, M., Chen, Q., Shan, Q., Liu, S., Lin, J., Ma, L., Zheng, G., Li, L., Zhao, C., Wei, L., Dai, X., & Yin, Y. (2023). Determination of amphenicol antibiotic residues in aquaculture products by response surface methodology modified QuEChERS method combined with UPLC-MS/MS. *Microchemical Journal*, 190, 108729. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108729>
- Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B. A., & Leung, K. Y. (2021). Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. In *Environmental Pollution* (Vol. 285, p. 117402). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>

Anexos

Anexo 1. Fotos y figuras

Visita a la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales



Anexo 1.1. Visita a la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales



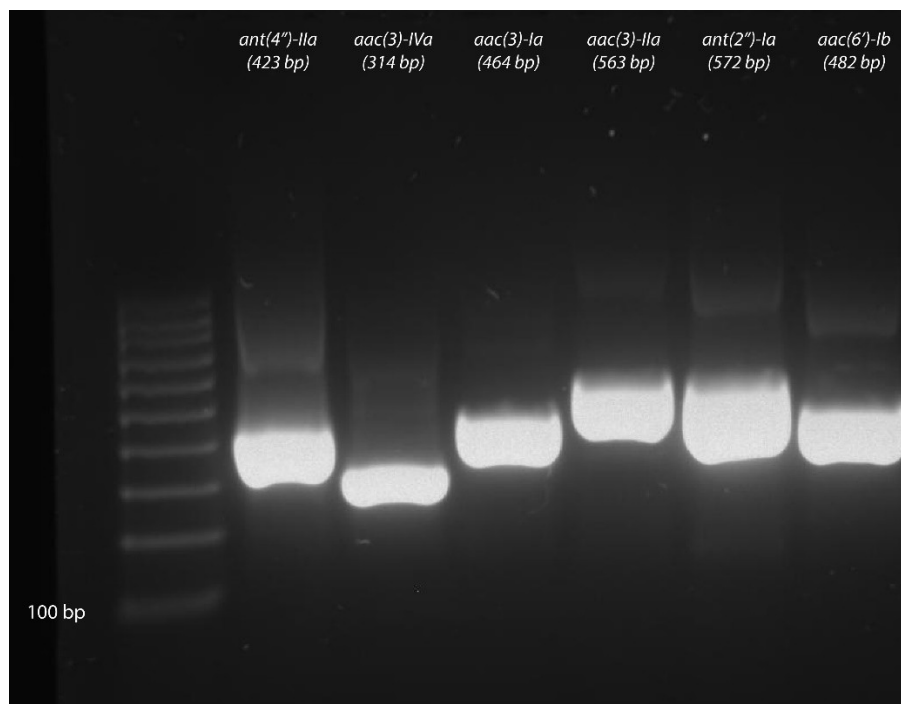
Anexo 1.2. Colecta de agua en Río Juan Díaz



Anexo 1.3. Fermentación del caldo lauril triptosa. Se observa el gas atrapado en las campanas Durham.



Anexo 1.4. Fermentación del caldo bilis verde brillante. Se observa el gas atrapado en las campanas Durham.



Anexo 1.5. Verificación de la amplificación de controles positivos para genes de los aminoglucósidos.

Gene/Insert name: tet(A)

Alt name: tetA

Species: *Morganella morganii*

Mutation: Sequence was codon optimized for *E. coli* K12 using the IDT codom optimizing tool

Anexo 1.6. Información de addgene sobre el vector pGDP4 tet(A)

Anexo 2. Tablas

Anexo 2.1. Genes de referencia utilizados para el diseño de genes sintéticos.

Gen	Proteína	NCBI	PDB
<i>npmA</i>	16S rRNA (adenine(1408)-N(1))-methyltransferase NpmA	WP_032492089	3MTE
<i>armA</i>	16S rRNA (guanine(1405)-N(7))-methyltransferase ArmA	UZS93138	3FZG
<i>rmtB</i>	16S rRNA (guanine(1405)-N(7))-methyltransferase RmtB	HBV7122394	3FRI
<i>ermC</i>	23S rRNA (adenine(2058)-N(6))-methyltransferase ErmC'	HAZ8343465	2ERC

Anexo 2.2. Fenotipos y genotipos de resistencia de los aislados resistentes a los aminoglucósidos.

No	Aislado	Fenotipo	Genotipo
1	A3	KAN, STR, NEO	<i>ant(3'')-Ia, aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
2	A4	GEN	
3	A5	GEN	
4	A6	GEN	
5	A7	STR	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
6	A8	NEO, GEN	
7	A9	KAN, NEO, GEN, TOB	
8	A10	NEO, GEN, AMI, TOB	
9	B1	KAN, STR, NEO, TOB	<i>aac(3)-IIa, ant(3'')-Ia, aph(3')-Ia</i>
10	B2	STR, GEN	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
11	B3	GEN	
12	B4	NEO, GEN	
13	B5	GEN	
14	B6	GEN, AMI	
15	B7	STR, AMI, TOB	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
16	B9	GEN, AMI	
17	B10	GEN	<i>aac(3)-IIa</i>
18	C1	STR, NEO, GEN	<i>ant(3'')-Ia, aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
19	C2	GEN, AMI	
20	C3	GEN	
21	C6	STR, NEO, AMI	<i>ant(3'')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
22	C7	STR	
23	C8	GEN, AMI	
24	C9	KAN, NEO, GEN, AMI	
25	C10	KAN, STR, NEO	<i>ant(3'')-Ia, aph(6)-Id</i>

26	D1	NEO, GEN, AMI	
27	D2	GEN	
28	D5	NEO, GEN, AMI	
29	D7	KAN, STR, NEO, GEN	<i>ant(3'')-Ia, aph(3')-Ia</i>
30	D8	STR, NEO	<i>ant(3'')-Ia</i>
31	D9	GEN, AMI	
32	E1	KAN, STR, NEO, GEN, AMI, TOB	<i>aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
33	E2	GEN	<i>ant(3'')-Ia</i>
34	E3	NEO, AMI	
35	E4	STR, NEO	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
36	E5	STR, NEO	<i>ant(3'')-Ia</i>
37	E6	GEN, TOB	
38	E7	KAN, NEO, GEN, AMI	
39	E8	GEN	
40	E9	NEO, GEN	
41	E10	GEN	
42	F1	NEO	
43	F2	NEO, GEN, AMI	
44	F3	STR, NEO, GEN	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
45	F5	KAN, STR, NEO, GEN, TOB	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
46	F6	KAN, STR, NEO, GEN	<i>ant(3'')-Ia, aph(3')-Ia</i>
47	F7	NEO, GEN	
48	F8	NEO, GEN, AMI	
49	F10	NEO, GEN, AMI	
50	G1	STR, NEO, GEN	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
51	G2	NEO, GEN, AMI	
52	G4	NEO, GEN	
53	G5	STR, NEO, GEN	<i>ant(3'')-Ia</i>
54	G7	STR, GEN	<i>ant(3'')-Ia</i>
55	G8	KAN, STR, GEN	<i>ant(3'')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
56	G9	NEO, GEN	
57	G10	GEN, AMI	
58	H1	GEN, AMI	
59	H3	NEO, AMI	
60	H4	NEO	
61	H6	GEN	<i>ant(3'')-Ia</i>
62	H7	AMI	
63	H8	GEN	
64	H9	KAN, STR, NEO, GEN, AMI	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
65	H10	GEN	
66	I1	NEO	
67	I2	GEN	
68	I3	GEN, AMI, TOB	<i>ant(3'')-Ia, aph(6)-Id</i>
69	I4	NEO	

70	I8	KAN, GEN	
71	I9	GEN	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
72	I10	GEN	
73	J1	NEO	
74	J2	STR, GEN	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
75	J3	STR	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
76	J4	STR, TOB	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
77	J5	GEN, AMI	
78	J6	STR, GEN	
79	J7	GEN	
80	J8	NEO	

Anexo 2.3. Resultados de los análisis de frecuencias de genes conjuntos.

	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>floR</i>	<i>cmlA</i>	<i>CatA1</i>	<i>aac(3)-IIa</i>	<i>ant(3'')-Ia</i>	<i>aph(3')-Ia</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>aph(6)-Id</i>
<i>tetA</i>	0	12.5	40.6	25	3.1	3.1	34.4	18.8	40.6	46.9
<i>tetB</i>	44.4	0	22.2	22.2	33.3	11.1	22.2	33.3	77.8	77.8
<i>floR</i>	92.9	14.3	0	57.1	7.1	7.1	64.3	35.7	35.7	50
<i>cmlA</i>	88.9	22.2	88.9	0	11.1	11.1	88.9	55.6	33.3	44.4
<i>CatA1</i>	33.3	100	33.3	33.3	0	0	33.3	33.3	100	100
<i>aac(3)-IIa</i>	50	50	50	50	0	0	50	50	0	0
<i>ant(3'')-Ia</i>	73.3	13.3	60	53.3	6.7	6.7	0	33.3	26.7	40
<i>aph(3')-Ia</i>	100	50	83.3	83.3	16.7	16.7	83.3	0	50	50
<i>aph(3'')-Ib</i>	76.5	41.2	29.4	17.6	17.6	0	23.5	17.6	0	100
<i>aph(6)-Id</i>	78.9	36.8	36.8	21.1	15.8	0	31.6	15.8	89.5	0

Anexo 3. Mapas de vectores, constructos y secuencias

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show

100

☒

select all

2 sequences selected

Graphics

Distance tree of results

Multiple alignment

MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	D7		119	119	100%	1e-42	90.91%	66	Query_111319
☒	A3		118	118	93%	2e-42	96.77%	62	Query_111318

A3

Sequence ID: **Query_111318** Length: **62** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 62 [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
118 bits(296)	2e-42	Compositional matrix adjust.	60/62(97%)	61/62(98%)	0/62(0%)
Query 1	LAFATRGWMAFPIMVLLASGGIGMPALQAILS	RQVDEERQGQLQGS	LAALTS	IVG	PL 60
Sbjct 1	LAFATRGWMAFPIMVLLASGGIGMPALQA+LSRQVDEERQGQLQGS	LAALTS	IVG	PL 60	
Query 61	LF	62			
Sbjct 61	LF	62			

D7

Sequence ID: **Query_111319** Length: **66** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 66 [Graphics](#)

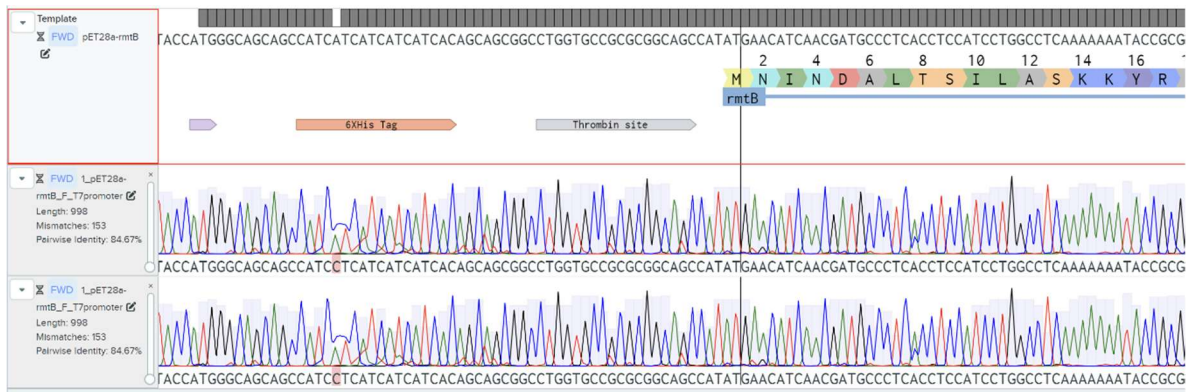
▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
119 bits(298)	1e-42	Compositional matrix adjust.	60/66(91%)	63/66(95%)	0/66(0%)
Query 1	LAFATRGWMAFPIMVLLASGGIGMPALQAILS	RQVDEERQGQLQGS	LAALTS	IVG	PL 60
Sbjct 1	LAFATRGWMAFPIMVLLASGGIGMPALQA+LSRQVDEERQGQLQGS	LAALTS	++	GPL 60	
Query 61	LFTAIY	66			
Sbjct 61	LFTAIY	66			

Anexo 3.1. Alineación de las secuencias de *tet(A)*, obtenidas por secuenciación SANGER y verificadas en bases de datos. Resultados para las cepa A3 y D7.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Pseudomonas aeruginosa R1033 cmlA1 gene for chloramphenicol efflux MFS transporter CmlA1, complete CDS	Pseudomonas a...	292	292	27%	7e-82	100.00%	1460	NG_047646.1
✓	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium IH184/03 cmlA1 gene for chloramphenicol efflux MFS...	Salmonella enter...	292	292	27%	7e-82	100.00%	1460	NG_047648.1
✓	Klebsiella pneumoniae ILT-3 cmlA1 gene for chloramphenicol efflux MFS transporter CmlA1, complete CDS	Klebsiella pneu...	292	292	27%	7e-82	100.00%	1460	NG_047647.1
✓	Klebsiella pneumoniae pCC416 cmlA5 gene for chloramphenicol efflux MFS transporter CmlA5, complete CDS	Klebsiella pneu...	292	292	27%	7e-82	100.00%	1460	NG_051436.1
✓	Pseudomonas aeruginosa K17 cmlA gene for CmlA family chloramphenicol efflux MFS transporter, complete CDS	Pseudomonas a...	292	292	27%	7e-82	100.00%	1460	NG_052155.1
✓	Comamonas jiangduensis S-X2B cmlA gene for CmlA family chloramphenicol efflux MFS transporter, complete ...	Comamonas jian...	292	292	27%	7e-82	100.00%	1460	NG_052326.1
✓	Pseudomonas aeruginosa RPL11 cmlA gene for chloramphenicol efflux MFS transporter CmlA6, complete CDS	Pseudomonas a...	292	292	27%	7e-82	100.00%	1460	NG_047655.1

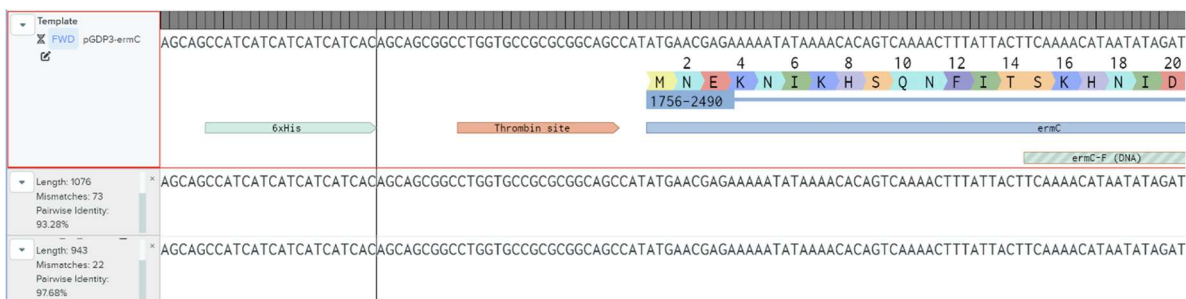
Anexo 3.2. Verificación en base de datos de la secuencia de *cmlA* obtenida por secuenciación SANGER. Resultado para la cepa A3.



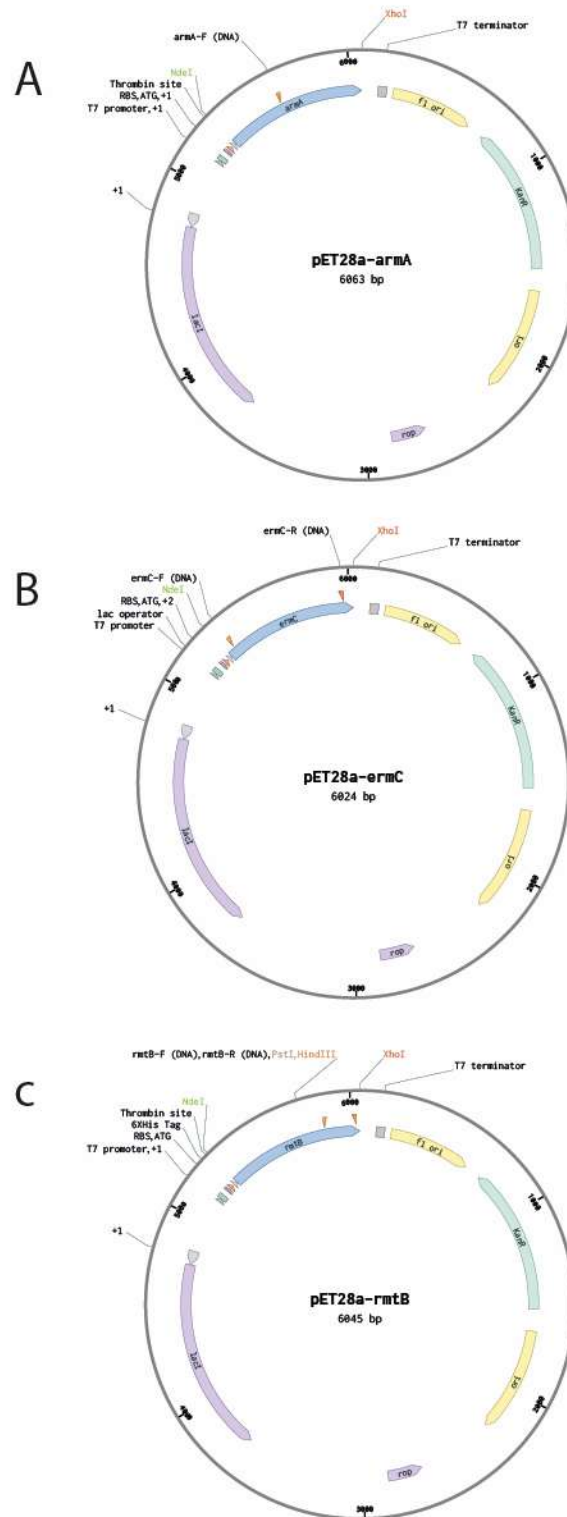
Anexo 3.3. Alineación de secuencias del vector de expresión pET28a-RmtB obtenidas por secuenciación SANGER contra el constructo diseñado.



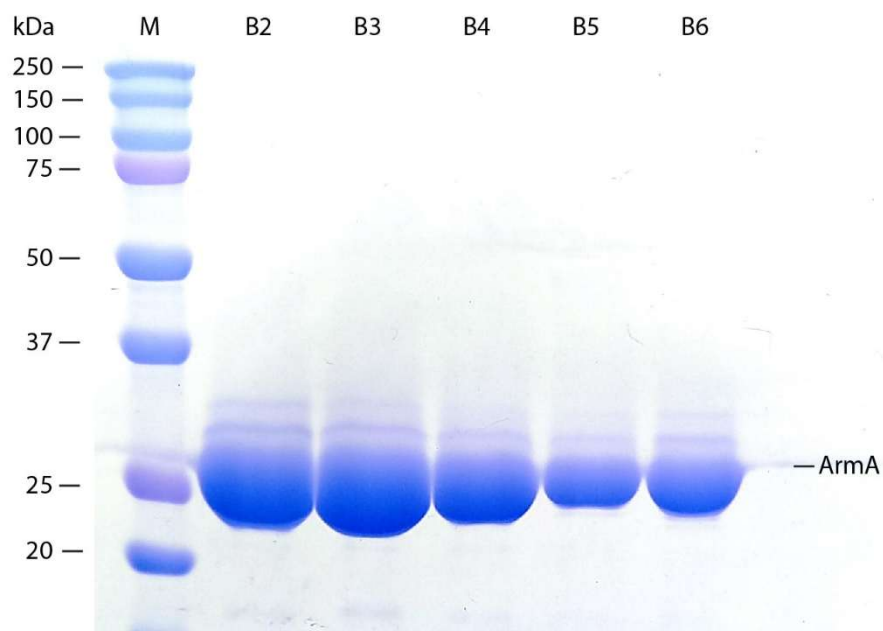
Anexo 3.4. Alineación de secuencias del vector pGDP3-ArmA obtenidas por secuenciación SANGER contra el constructo diseñado.



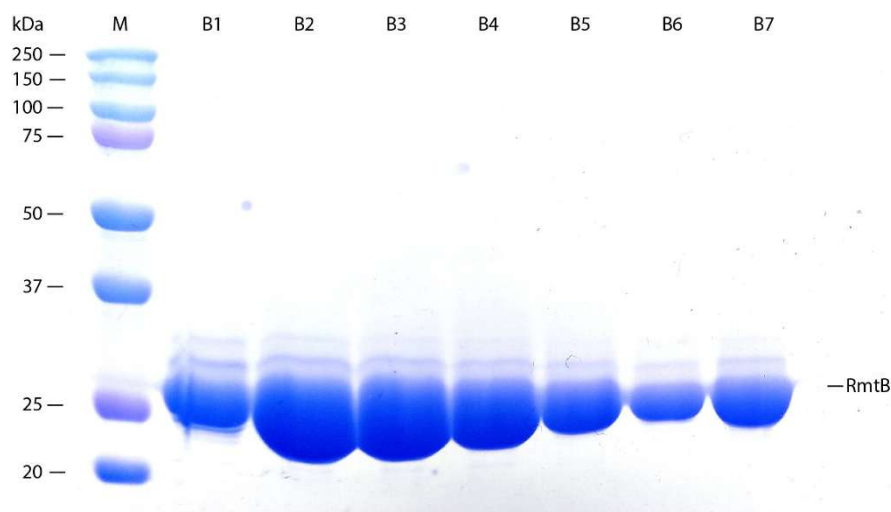
Anexo 3.5. Alineación de secuencias del vector pGDP3-ErmC obtenidas por secuenciación SANGER contra el constructo diseñado.



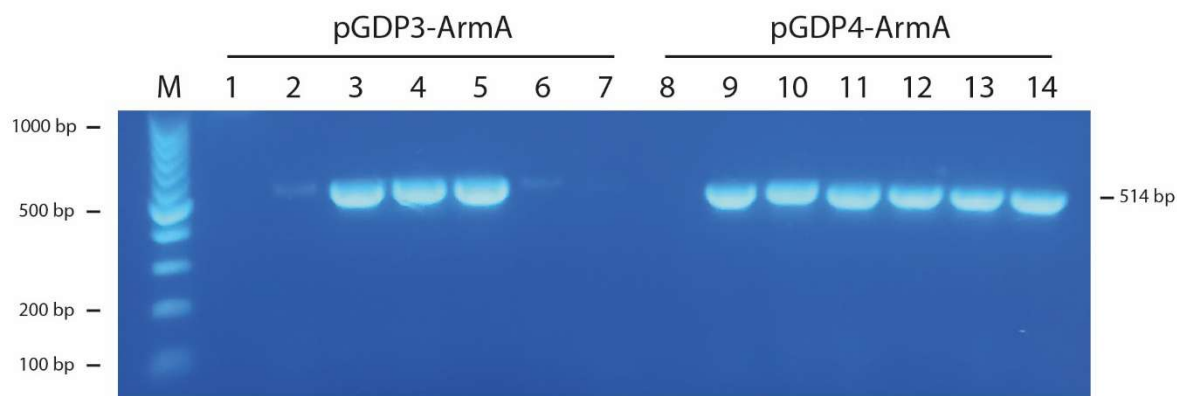
Anexo 3.6. Constructos clonados en vector pET28a: (A) pET28a-arma, (B) pET28a-ermC y (C) pET28a-rmtB.



Anexo 3.7. Verificación de fracciones obtenidas en la purificación por exclusión molecular de ArmA analizadas mediante SDS-PAGE



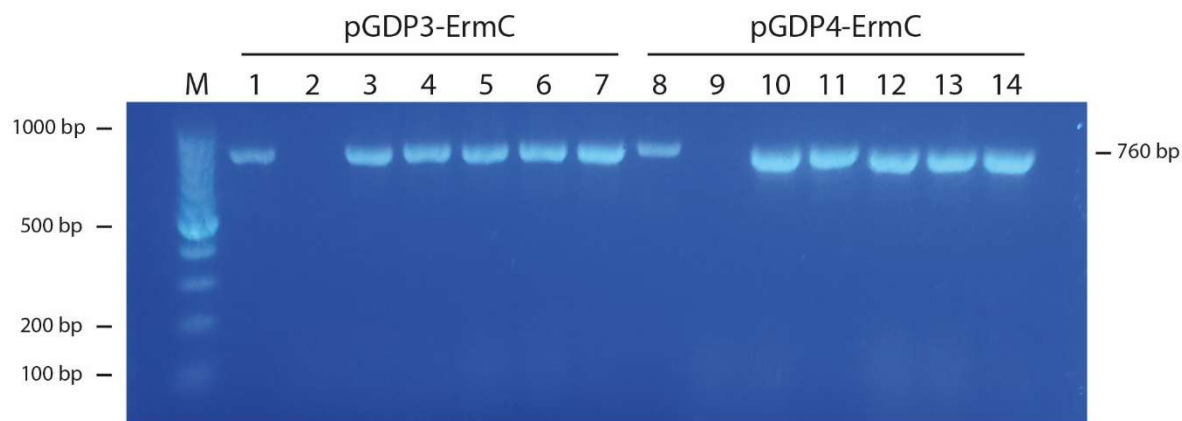
Anexo 3.8. Verificación de fracciones obtenidas en la purificación por exclusión molecular de RmtB analizadas mediante SDS-PAGE.



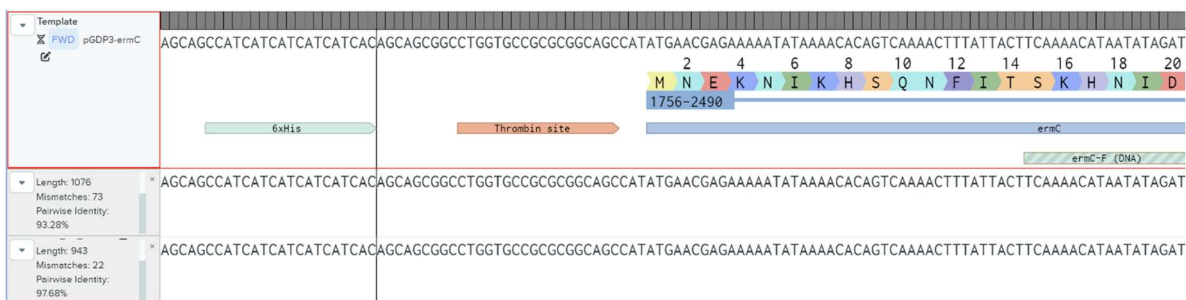
Anexo 3.9. Verificación de clonaje de pGDP3-ArmA y pGDP4-ArmA.



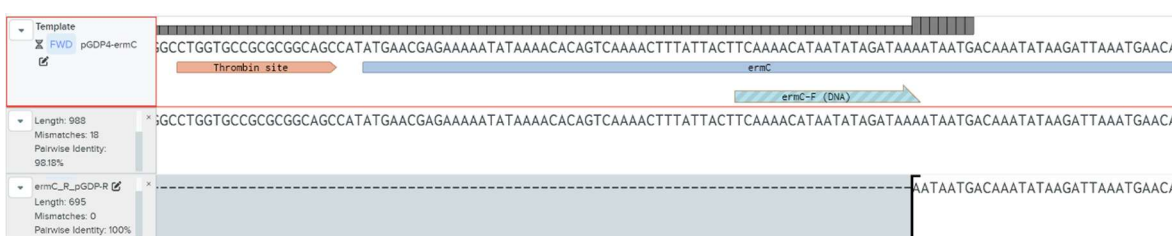
Anexo 3.10. Alineación de secuencias del vector pGDP3-ArmA obtenidas por secuenciación SANGER contra el constructo diseñado.



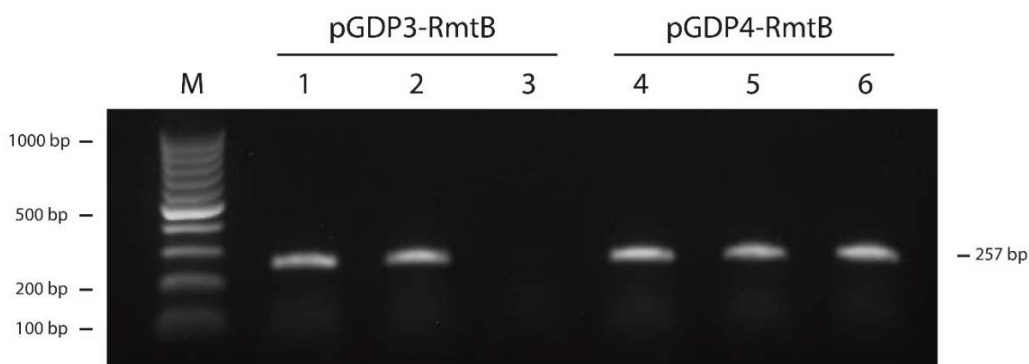
Anexo 3.11. Verificación de clonaje de pGDP3-ErmC y pGDP4-ErmC.



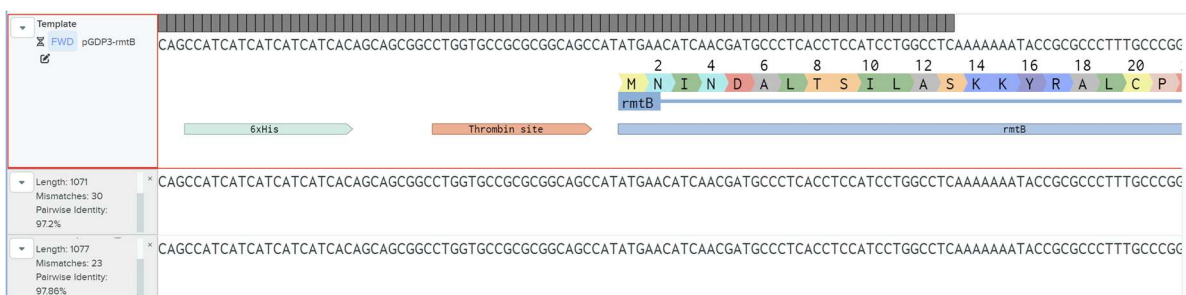
Anexo 3.12. Alineación de secuencias del vector pGDP3-ErmC obtenidas por secuenciación SANGER contra el constructo diseñado.



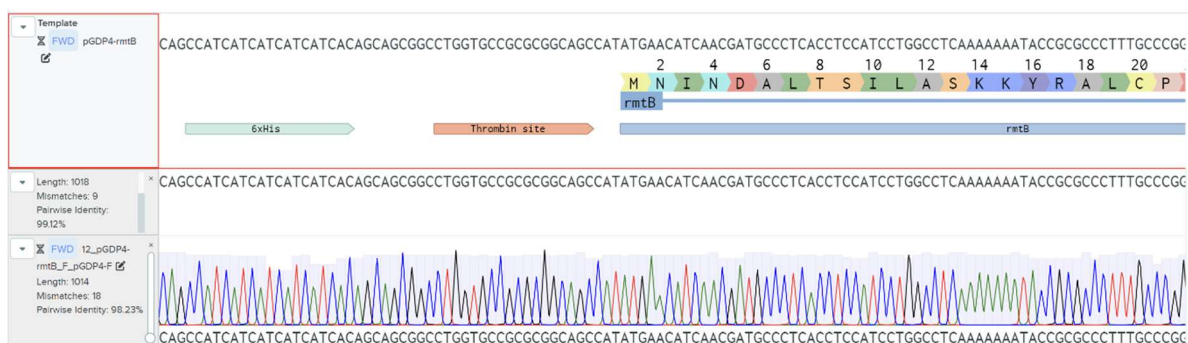
Anexo 3.13. Alineación de secuencias del vector pGDP4-ErmC obtenidas por secuenciación SANGER contra el constructo diseñado.



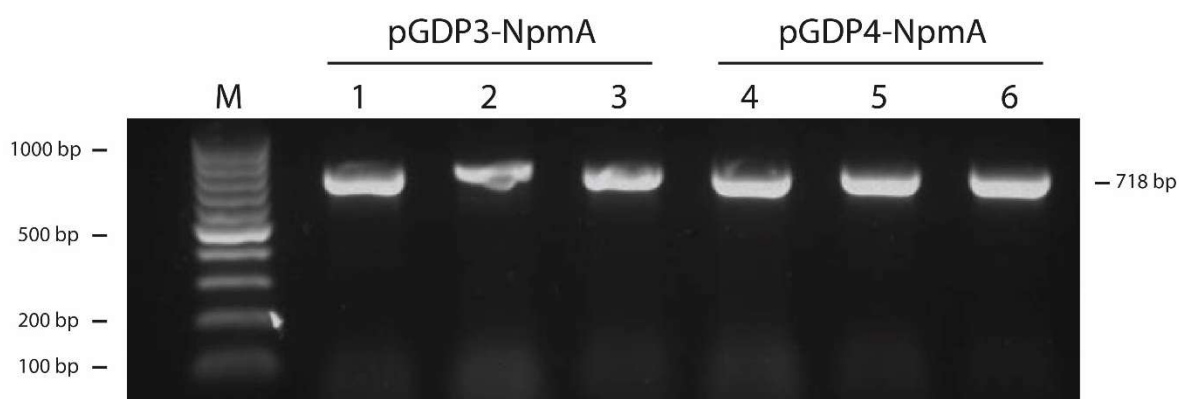
Anexo 3.14. Verificación de clonaje de pGDP3-RmtB y pGDP4-RmtB.



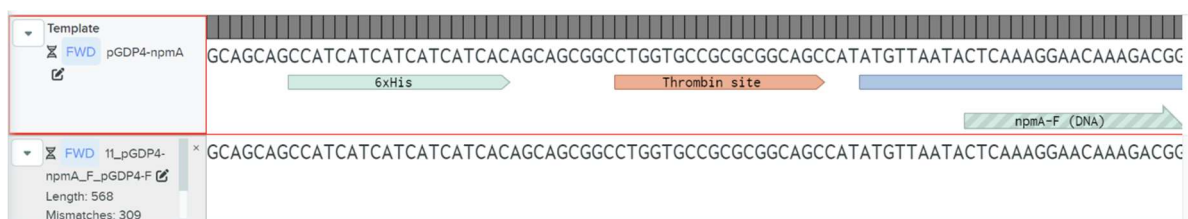
Anexo 3.15. Alineación de secuencias del vector pGDP3-RmtB obtenidas por secuenciación SANGER contra el constructo diseñado.



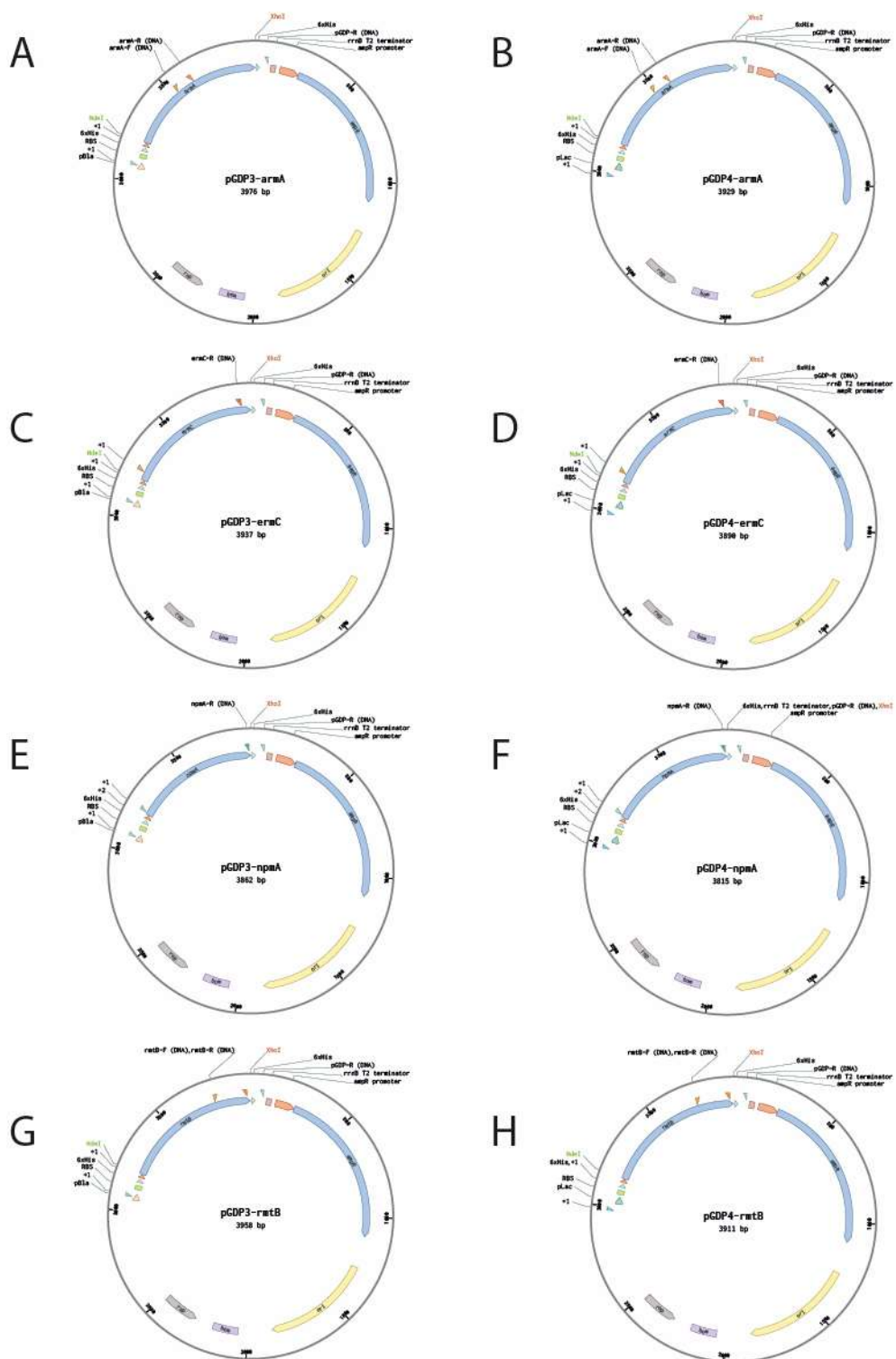
Anexo 3.16. Alineación de secuencias del vector pGDP4-RmtB obtenidas por secuenciación SANGER contra el constructo diseñado.



Anexo 3.17. Verificación de clonaje de pGDP3-NpmA y pGDP4-NpmA.



Anexo 3.18. Alineación de secuencia del vector pGDP4-NpmA obtenida por secuenciación SANGER contra el constructo diseñado.



Anexo 3.19. Constructos clonados en la serie pGDP: (A) pGDP3-armA, (B) pGDP4-armA, (C) pGDP3-ermC, (D) pGDP4-ermC, (E) pGDP3-npmA, (F) pGDP4-npmA, (G) pGDP3-rmtB y (H) pGDP4-rmtB.

Anexo 4. Composiciones y formulaciones

Azul de Coomassie (250 mL)

- 0.25 g de Coomassie Brilliant Blue R250
- 100 mL de metanol
- 25 mL de ácido acético glacial
- 125 mL de agua destilada

Solución de decoloración

- 100 mL de metanol
- 25 mL de ácido acético
- 125 mL de agua destilada

Gel de poliacrilamida al 10% (suficiente para preparar 2 geles):

- 4.0 mL de solución acrilamida:bisacrilamida (30%)
- 1.2 mL de glicerol (50%)
- 2.4 mL de Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)
- 4.4 mL de agua
- 12 µL de TEMED
- 120 µL de persulfato de amonio (10%)

Tampón de corrida Tris-glicina pH 8.3 - 5X (Tris 135 mM, glicina 960 mM, EDTA 5 mM):

- 16.3 g de Tris base
- 72 g de glicina
- 1.8 g de EDTA sal disódica
- Transferir a contenedor de 1 L, agregar ~600 mL de agua y mezclar con agitador magnético. Ajustar el volumen de agua a 1 L. No se requiere ajuste de pH. Se puede almacenar a temperatura ambiente.