

**CONTAMINANTES EMERGENTES EN EL AGUA Y SUS IMPLICACIONES
AMBIENTALES: RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS,
UN PROBLEMA A ESCALA MUNDIAL**

DIEGO FERNANDO CASTELLANOS SUÁREZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA AMBIENTAL

BUCARAMANGA

2016

**CONTAMINANTES EMERGENTES EN EL AGUA Y SUS IMPLICACIONES
AMBIENTALES: RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS,
UN PROBLEMA A ESCALA MUNDIAL**

DIEGO FERNANDO CASTELLANOS SUÁREZ

**Monografía de grado para optar al título de Especialista en Química
Ambiental**

Director:

RICARDO RESTREPO MANRIQUE

Biólogo Especialista en Química Ambiental

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA AMBIENTAL

BUCARAMANGA

2016

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GENERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. METODOLOGÍA	20
4. CONTAMINANTES EMERGENTES	21
5. FÁRMACOS	24
6. ANTIBIÓTICOS	26
6.1 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS	26
6.1.1 <i>Afectación bacteriana</i>	27
6.1.2 <i>Según el mecanismo de acción</i>	27
6.1.3 <i>Clasificación según sus estructuras químicas</i>	29
6.2 ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS	30
6.2.1 <i>Propiedades químicas y clasificación de los antibióticos betalactámicos</i>	32
6.2.2 <i>Mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos</i>	38
7. IMPACTO ECOLÓGICO DE LOS ANTIBIÓTICOS	40
7.1 ECOTOXICIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA BIOTA ACUÁTICA	40
7.2 ECOTOXICIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS	41
7.3 EFECTOS TOXICOLÓGICOS DE LOS ANTIBIÓTICOS Y SU RELACIÓN CON LAS ESPECIES	42
7.3.1 <i>Antibióticos betalactámicos</i>	43
7.3.2 <i>Otros antibióticos: quinolonas, tetraciclinas, macrólidos y aminoglucósidos.</i>	44
8. RESISTENCIA BACTERIANA	46

9. CONTAMINACIÓN EMERGENTE: GENES DE RESISTENCIA BACTERIANA	49
10. EFECTOS DE LOS GENES DE RESISTENCIA EN EL ECOSISTEMA	51
10.1 FAUNA SILVESTRE COMO RESERVORIOS DE GENES DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS	52
10.2 PROBLEMÁTICA DE LOS DETERMINANTES DE RESISTENCIA A LOS BETALACTÁMICOS – LAS BETALACTAMASAS	54
11. BASES GENÉTICAS DE LA RESISTENCIA BACTERIANA	60
11.1 MUTACIÓN	61
11.2 TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE ADN	63
12. MECANISMOS GENERALES DE RESISTENCIA BACTERIANA	67
12.1 MODIFICACIÓN DIRECTA DEL ANTIBIÓTICO	67
12.2 DISMINUCIÓN DE LA PERMEABILIDAD	67
12.3 BOMBAS DE EFLUJO	68
12.4 ALTERACIÓN EN LOS SITIOS BLANCOS DEL ANTIBIÓTICO	68
13. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS	70
13.1 ALTERACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A PENICILINAS (PBPS)	70
13.2 DISMINUCIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA	72
13.3 BOMBAS DE EFLUJO	75
13.4 MODIFICACIÓN DIRECTA DEL ANTIBIÓTICO (BETALACTAMASAS)	77
14. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN MUESTRAS AMBIENTALES	79
15. CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA	84

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características químicas de las diferentes clases de antibióticos.	29
Tabla 2. Clasificación de los antibióticos betalactámicos.	35

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Número de trabajos realizados sobre contaminantes emergentes en los últimos años. (fuente: www.scopus.com)	22
Figura 2. Porcentaje de trabajos realizados sobre contaminantes emergentes según el área técnica de estudio. (fuente: www.scopus.com)	22
Figura 3. Número de publicaciones sobre resistencia bacteriana desde 1975 a la fecha. (fuente: www.scopus.com)	46
Figura 4. Porcentaje de trabajos realizados sobre resistencia bacteriana por área técnica de estudio. (fuente: www.scopus.com)	47
Figura 5. Rutas y factores implicados en la resistencia y su diseminación. ^{34, 133, 138, 139, 141, 153}	54
Figura 6. Distribución de las principales familias de betalactamasas a nivel mundial. ^{161, 180–183,245}	56
Figura 7. Resistencia de <i>escherichia coli</i> a cefalosporinas de tercera generación. ⁶	58
Figura 8. Resistencia de <i>klebsiella pneumoniae</i> a cefalosporinas de tercera generación. ⁶	59
Figura 9. Mecanismos de resistencia bacterianos a los diferentes antibióticos. ¹⁸⁸ 218-220	69

ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BLEE	Betalatamasas de Espectro Extendido
CIDEIM	Centro Internacional de Entrenamiento e Investigación
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
EC	Electroforesis capilar
Familia ABC	Familia de unión a casete de ATP
Familia MATE	Familia de expulsión de fármacos y tóxicos
Familia MFS	Familia de facilitador mayor
Familia RND	Familia de resistencia a división por nodulación
GREBO	Grupo para el control de la resistencia antimicrobiana en Bogotá
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBPs	Proteínas de unión a penicilinas

RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
SOS	Sistema de reparación de emergencia

RESUMEN

TITULO: CONTAMINANTES EMERGENTES EN EL AGUA Y SUS IMPLICACIONES AMBIENTALES: RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS BETALECTÁMICOS, UN PROBLEMA A ESCALA MUNDIAL.*

AUTOR: DIEGO FERNANDO CASTELLANOS SUÁREZ.**

Palabras claves: Resistencia bacteriana, antibióticos, antibióticos betalactámicos, contaminantes emergentes, mecanismos de resistencia, transferencia horizontal.

Introducción: Actualmente, los antibióticos como contaminantes emergentes son un tema de mucha preocupación por sus efectos en la biota acuática. La liberación constante de antimicrobianos al ambiente ha generado durante mucho tiempo que patógenos bacterianos de gran importancia clínica como *Escherichia coli*, sean consideradas una amenaza, debido a la resistencia adquirida a los diferentes antibióticos de importancia médica, como por ejemplo los betalactámicos. Estudios han permitido determinar que estos compuestos no sólo afectan las comunidades microbianas, sino también otros grupos de organismos acuáticos y terrestres que presentan funciones ecológicas importantes, como el fitoplancton y las macrófitas. Los contaminantes emergentes de origen antibiótico betalactámico siguen su constancia de crecimiento por el abuso excesivo de estos en los diferentes tratamientos de enfermedades que a la postre generaran sinergismo de resistencia llevando a estos antibióticos sean cada vez más concentrados y por ende sean causantes de nuevas anomalías en los ecosistemas acuáticos.

Objetivos: Desarrollar redes de monitoreo y vigilancia como plan de contención para este problema a nivel mundial, e identificar los factores que facilitan

Conclusiones: Los antimicrobianos han acelerado el desarrollo de mecanismos biológicos de resistencia de las bacterias, como estrategia para sobrevivir a condiciones adversas impuestas por la contaminación antropogénica. Esta presión selectiva ha permitido también la aparición de eventos de transferencia de elementos genéticos móviles, los cuales han ocasionado una rápida adquisición de genes codificantes de proteínas relacionadas con los mecanismos de resistencia.

*Trabajo de Grado

**Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Especialización en Química Ambiental. Director: RESTREPO MANRIQUE Ricardo. Biólogo Especialista en Química Ambiental.

ABSTRACT

TITLE: EMERGING CONTAMINANTS IN WATER AND ENVIRONMENTAL IMPLICATIONS: RESISTANCE TO ANTIBIOTICS BETA-LACTAMS, A GLOBAL PROBLEM.*

AUTHOR: DIEGO FERNANDO SUAREZ CASTELLANOS.**

Keywords: bacterial resistance, antibiotics, beta-lactam antibiotics, emerging contaminants, resistance mechanisms, horizontal transfer.

Introduction: Currently, antibiotics and emerging pollutants are an issue of great concern for their effects on aquatic biota. The continuous release of antimicrobials into the environment has generated long to bacterial pathogens of great clinical importance as *Escherichia coli*, they are considered a threat, due to acquired resistance to different antibiotics of medical importance, such as beta-lactams. Studies have established that these compounds not only affect microbial communities, but also other groups of aquatic and terrestrial organisms that have important ecological functions, such as phytoplankton and macrophytes. Emerging contaminants lactam antibiotic origin continue its growth record by excessive abuse of these in the different treatments of diseases that ultimately generate synergism leading resistance to these antibiotics are increasingly concentrated and therefore are causing new anomalies aquatic ecosystems.

Objectives: Develop monitoring and surveillance networks as containment plan for this global problem, and identify the factors that facilitate

Conclusions: Antimicrobial have accelerated the development of biological mechanisms of bacterial resistance as a strategy to survive adverse conditions imposed by anthropogenic pollution. This selective pressure has also enabled the emergence of transfer events mobile genetic elements which have led to a rapid acquisition of genes encoding proteins related to resistance mechanisms.

*Degree Paper

**Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Especialización en Química Ambiental. Director: RESTREPO MANRIQUE Ricardo. Biólogo Especialista en Química Ambiental.

INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes son compuestos químicos orgánicos, sintéticos y subproductos generados de su propia degradación; aunque su presencia no es nueva, si lo son sus efectos adversos en la salud humana y en el ambiente.^{1,2} La principal característica de estos compuestos es que no requieren ser persistentes en el ambiente para provocar efectos negativos.³ Este tipo de contaminantes incluye una lista de productos de uso personal, farmacéuticos, aditivos industriales y una gran variedad de elementos químicos. La falta de conocimiento sobre la incidencia y riesgos no están aún muy claros para la mayoría de estas sustancias, por lo que es necesario el desarrollo de técnicas analíticas que permitan monitorear este tipo de contaminantes.⁴

Entre los contaminantes emergentes los fármacos han recibido gran atención, en especial los antibióticos² debido a la resistencia que han adquirido muchas cepas bacterianas. Esto ha ocasionado que la efectividad de los tratamientos actuales se haya reducido frente a muchas enfermedades infecciosas.⁵ Actualmente, la resistencia microbiana a los antibióticos es un serio problema de salud a nivel mundial.^{6,7} Los antibióticos betalactámicos son una gran familia de sustancias antimicrobianas que se caracterizan por la presencia de un anillo betalactámico en su estructura molecular. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis del péptidoglucano de la pared bacteriana.^{8,9} Su importancia clínica radica en su alto espectro, su poder bactericida y sus mínimos efectos secundarios,⁸ por lo que es uno de los principales grupos de antibióticos empleados en los tratamientos infecciosos.^{5,10,11} Sin embargo, el uso excesivo de estas sustancias, el desarrollo de nuevos antimicrobianos y el proceso de selección evolutivo que ejercen los antibióticos sobre las comunidades microbianas nativas, han permitido el desarrollo de bacterias multirresistentes a diversos tipos de fármacos.^{6,12,13}

Uno de los principales focos de resistencia bacteriana son las aguas residuales, las cuales son en muchos casos vertidas directamente a las fuentes hídricas.¹⁴ Actualmente, muchas de las plantas de tratamiento de potabilización para consumo humano no están diseñadas con sistemas que puedan procesar y eliminar residuos de fármacos, por lo que se convierten en un riesgo para el ecosistema y para los seres humanos.¹⁴

Para la determinación de los diversos tipos de antibióticos betalactámicos actualmente se emplean diferentes técnicas analíticas, cada una con sus ventajas y desventajas.¹⁵ Dentro de estas técnicas están los métodos cromatográficos, no cromatográficos y electroforesis. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el método más utilizado en la determinación de antibióticos en concentraciones de nanogramos / litro.¹⁵ El HPLC puede ir acoplado con un sistema de espectrometría de masas, permitiendo el análisis de elementos polares, no volátiles y un aumento en su especificidad.^{16,17}

En la actualidad, muchos patógenos bacterianos que años atrás se consideraban bajo control, exhiben una fuerte resistencia a los antibióticos betalactámicos.^{6,18,19} Para entender el proceso evolutivo de la resistencia bacteriana es necesario conocer los eventos fisiológicos y genéticos que están implicados en la adaptabilidad a situaciones de estrés por efecto de los antibióticos.^{12,20} En los ecosistemas, la existencia de una gran diversidad de microorganismos ha llevado a pensar que la producción de los antibióticos por bacterias ambientales cumple sólo una función inhibitoria; sin embargo, se ha demostrado que estos compuestos influyen en la transcripción de muchos procesos celulares en bajas concentraciones, al actuar como bioactivadores,²⁰⁻²³ pero en concentraciones altas como las utilizadas en los procesos terapéuticos son tóxicas.⁹

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un evento co-evolutivo muy importante.²⁴ Se ha determinado que muchos de los organismos que producen

antibióticos presentan genes implicados en la síntesis y activación de rutas metabólicas para su biosíntesis; así mismo, presentan un mecanismo de resistencia para protegerse de esos compuestos (genes a la resistencia)²⁴ y en conjunto forman un complejo de genes denominados “resistomas”.²² Estos genes pueden ser compartidos entre una bacteria patógena (no resistente) y una ambiental (resistente) por transferencia horizontal de genes, de manera rápida.²⁵

Los mecanismos genéticos involucrados en la adquisición de resistencia bacteriana pueden ser por origen de un nuevo gen o por transferencia horizontal de elementos genéticos móviles.^{19,26} El primero de ellos, se basa en mutaciones puntuales de forma espontánea y al azar. Estudios han demostrado que algunas poblaciones presentan tasas de mutación altas, debido a que las bacterias no presentan un óptimo mecanismo de reparación de ADN,²⁷ como las células eucariotas. En consecuencia este tipo de mutaciones puede ocasionar cambios en los sistemas de captación y expulsión,²⁸ alteraciones en los sitios de unión para los fármacos y enzimas capaces de inactivar los antibióticos.^{12,20} Uno de los principales mecanismos de resistencia para los antibióticos betalactámicos son las betalactamasas,¹² que han sido reportadas en muchos patógenos que utilizan este mecanismo de resistencia.^{18,19,26,29-32}

Otro mecanismo importante en la adquisición de resistencia bacteriana, lo constituye la transferencia horizontal de genes,³³ que consiste en el paso de genes o de material genómico móvil, como transposones, integrones y plásmidos extra cromosómico entre organismos de la misma especie o género, mediante conjugación, transformación y transducción.^{34,35} Por lo tanto este mecanismo de transferencia horizontal es el principal proceso de adquisición de genes de resistencia por bacterias.³⁶

A pesar que desde hace más de dos décadas no existe un nuevo tipo de antibiótico comercial betalactámico, siguen siendo de los más prescritos para la

atención primaria y en hospitales.^{8,37} El metabolismo de la mayoría de los antibióticos betalactámicos en humanos y en animales domésticos es casi nula, lo que ha ocasionado que sus compuestos activos sean eliminados de una manera intacta al medio ambiente,⁸ permitiendo que exista un proceso de selección o estrés para los microorganismos. Teniendo en consideración lo anteriormente descrito, el objetivo general de este trabajo es el de realizar una revisión bibliográfica sobre los antibióticos betalactámicos, como contaminantes emergentes y su impacto ambiental en los ecosistemas acuáticos.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de manera no controlada y excesiva de antibióticos por parte de las comunidades y de las instituciones de la salud, ha generado la aparición de bacterias resistentes a los antimicrobianos. Este hecho genera preocupación a nivel mundial, debido a la dificultad de tratar ciertas enfermedades infecciosas, que años atrás se creían controladas.⁶ Es por ello que desde hace dos décadas la Organización Mundial de la Salud ha desarrollado un plan de contención a nivel mundial para esta problemática.⁶

En Colombia, a partir del año 2000 se establecieron redes de monitoreo y vigilancia en algunas ciudades del país. Algunos de estos grupos son: Grupo para el control de la Resistencia Antimicrobiana en Bogotá (GREBO), conformado por 27 instituciones a nivel nacional y 8 a nivel regional, el grupo del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigación Médicas (CIDEIM), integrado por varios hospitales en Bogotá, Medellín y Bucaramanga, entre otros.³⁸

La resistencia microbiana a nivel hospitalario ha aumentado en Colombia, donde se ha reportado resistencia a los antibióticos betalactámicos del 70% al 80% para *Staphylococcus spp.*, 22% para *Escherichia coli* y para *Klebsiella pneumoniae* del 26%, entre otros microorganismos.³⁹

Según el reporte de la Organización Mundial de la Salud de 2014, se ha encontrado resistencia a uno o a varios tipos de fármacos para cinco tipos de bacterias que son de gran importancia mundial, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, todas resistentes a los antibióticos betalactámicos. Estos antibióticos son muy utilizados en el tratamiento primario hospitalario y veterinario, debido a que presentan un alto espectro de acción microbiana; cabe resaltar que el metabolismo de estos antimicrobianos es casi nulo por humanos y animales

domésticos, provocando la excreción de sus componentes activos de forma directa a las aguas residuales, las cuales llegan a cuerpos de agua superficiales en el medio ambiente.^{8,40} Esto permite que exista una mayor interacción de las bacterias ambientales, patógenos, animales terrestres, incluyendo el humano, incrementando la preocupación del efecto ecológico de los antibióticos a nivel mundial.⁴⁰

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Recopilar y analizar información bibliográfica sobre los antibióticos betalactámicos como contaminantes emergentes y su impacto ambiental en los ecosistemas acuáticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una revisión bibliográfica de la problemática de los antibióticos betalactámicos como uno de los principales contaminantes emergentes de los ecosistemas acuáticos.
- Describir los mecanismos biológicos involucrados en la acción de los antibióticos, específicamente de los antibióticos betalactámicos en la biota dulceacuícola.
- Establecer los métodos analíticos utilizados para la determinación de estos contaminantes en aguas.
- Elaborar un documento que contenga información actualizada sobre la problemática de los antibióticos como contaminantes emergentes en ecosistemas acuáticos.

3. METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda bibliográfica como estado del arte por medio de la biblioteca virtual con algunas de las bases de datos disponibles en la Universidad Industrial de Santander (UIS) como SCIENCE@DIRECT, SPRINGER, WEB OF SCIENCE, entre otras. De igual manera se utilizaron servidores externos como Google Scholar y Pubmed. La búsqueda se desarrolló empleando palabras claves como: *emerging contaminants*, *bacterial resistance*, *bacterial resistance mechanisms*, *antibiotic resistance*, *emerging contaminants and antibiotics*, *beta-lactams antibiotics*, *bacterial resistance to beta-lactams*. La información se analizó en estudios publicados en artículos y revisiones de revistas científicas en los idiomas inglés y español, comprendiendo el periodo de 2005 a 2015.

Se recopiló y analizó la información de los mecanismos biológicos involucrados en los procesos de resistencia a los antibióticos betalactámicos por parte de la biota dulceacuícola.

Se llevaron a cabo reuniones periódicas de avances de la monografía con el tutor del proyecto, con el objetivo de realizar un análisis y corrección de la información.

4. CONTAMINATES EMERGENTES

Durante los últimos años, la aparición de compuestos traza o microcontaminantes en las fuentes hídricas naturales y de uso humano, ha generado preocupación a nivel mundial debido a sus efectos negativos en los ecosistemas y en la salud humana.⁴¹

Los contaminantes emergentes son productos químicos, que están presentes en la naturaleza en concentraciones muy bajas (ng/L), permitiéndoles pasar inadvertidos.⁴² Los contaminantes emergentes incluyen sustancias de origen orgánico, sintético y subproductos generados de su degradación, los cuales en algunos casos son más tóxicos que los compuestos que los originaron.¹⁴ Actualmente, existe poca información acerca de los verdaderos efectos nocivos de muchos de estos compuestos,⁴³ debido a las limitaciones en las técnicas de detección y análisis, dificultando de esta manera su regulación a nivel mundial.⁴⁴ Sin embargo, el mejoramiento de técnicas analíticas para algunos tipos de compuestos,⁴² ha permitido determinar la presencia de estos contaminantes en aguas superficiales, aumentando de forma alarmante la preocupación por la contaminación de las fuentes hídricas,⁴⁵ por lo que hoy en día han aumentado los estudios sobre estos compuestos traza, principalmente en áreas como la medicina y el medio ambiente (gráficas 1 y 2).

Figura 1. Número de trabajos realizados sobre contaminantes emergentes en los últimos años. (Fuente: www.scopus.com)

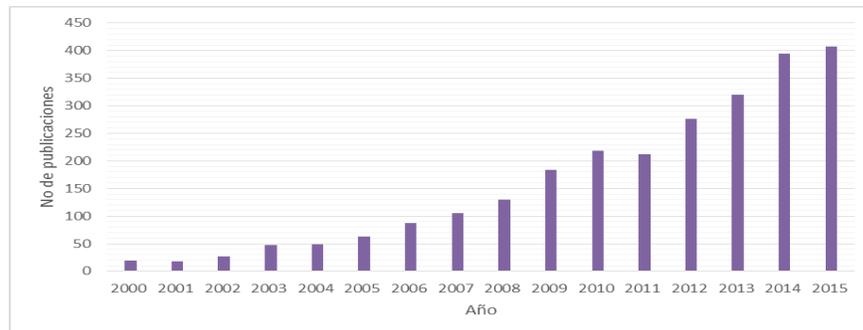
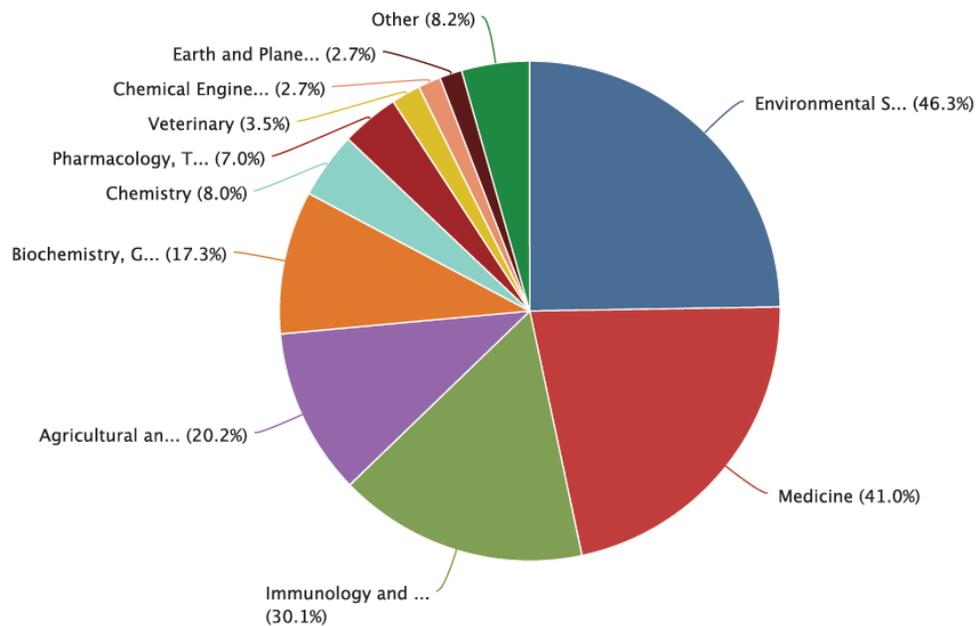


Figura 2. Porcentaje de trabajos realizados sobre contaminantes emergentes según el área técnica de estudio. (Fuente: www.scopus.com)



Uno de los principales problemas de contaminación de las aguas superficiales del planeta, se debe a que estos cuerpos hídricos son usados como receptores de las aguas residuales de las actividades humanas.⁴⁵ Por lo tanto, las aguas residuales son el principal foco de contaminates emergentes, debido a que no existen plantas de tratamiento capaces de remover estos compuestos, ya que estos sistemas estan diseñados para la eliminación de material orgánico y

contaminantes establecidos en la normatividad.^{40,45,46} Por lo tanto, se requiere de un mayor aporte en el conocimiento de las propiedades físico-químicas de estos contaminantes, con el objetivo de proponer sistemas o mecanismos de transformación y eliminación adecuados, permitiendo minimizar sus efectos adversos en los ecosistemas.^{47, 48}

Los contaminantes emergentes están constituidos por una amplia lista de productos químicos, fármacos, productos de cuidado personal, plastificantes y aditivos industriales.⁴³ Sin embargo, actualmente algunos de estos compuestos reciben mayor atención por la comunidad científica y ambiental, debido a que son sustancias de las cuales se tiene poca información acerca de sus métodos de análisis, efectos tóxicos y efectos ambientales.² Entre estos compuestos se encuentran: pesticidas, retardantes de llama bromados, fármacos, cloroalcanos y los metabolitos generados por su propia degradación.²

5. FÁRMACOS

Unos de los principales contaminantes emergentes lo constituyen los fármacos.² Estos compuestos han originado gran preocupación en los últimos años, debido a su continua introducción al medio ambiente y a sus efectos en la salud humana a través de la cadena trófica y aguas de consumo humano.⁴⁹ Los fármacos son compuestos bioactivos, capaces de interactuar con macromoléculas, permitiendo su entrada a diferentes rutas metabólicas en humanos y animales; sin embargo, cuando estas sustancias son introducidas al medio, pueden ocasionar que los organismos expuestos a ellos, presenten afectaciones en algunas vías metabólicas muy similares que en los humanos, afectando tejidos y órganos.⁵⁰

Pruebas tóxicológicas sugieren que estos compuestos presentan un bajo efecto tóxico agudo para la biota acuática.⁵¹ Sin embargo, cuando los organismos son expuestos de manera continua y a bajas concentraciones, ocasiona problemas crónicos en los organismos.⁵¹ En la actualidad, existe importante información que demuestra los efectos ecotoxicológicos en los organismos.⁵² Un ejemplo del efecto de estos contaminantes lo constituye un estudio realizado en *Rutilus rutilus*, una especie de pez de agua dulce presente en los ríos de Inglaterra, en el que se determinó el efecto feminizador de los estrógenos sintéticos en las poblaciones silvestres de estos peces, encontrando un desarrollo incompleto de la estructura gonadal y cambios en el comportamiento de cortejo de los machos.⁵³ En conclusión, este efecto feminizador de los machos trae como consecuencia graves problemas en la estructura poblacional de esta especie.⁵³ Otros estudios han mostrado el efecto adverso de los fármacos (antiinflamatorios, analgésicos, antibióticos, hormonas sexuales y otros) en el crecimiento y desarrollo de especies de peces, micro y macroinvertebrados, plantas y algas.^{52,54} Aunque estos compuestos se encuentran en muy bajas concentraciones en la naturaleza y presentan una vida media baja en comparación a otros compuestos como el

Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT), estas moléculas se comportan de manera persistente en el medio, debido a que son introducidas de manera constante al medio (pseudopersistencia).⁵⁵

6. ANTIBIÓTICOS

Los antimicrobianos son sin lugar a duda una de las formas quimioterapéuticas más exitosas en la historia de la humanidad, debido a que han permitido tener bajo control muchas enfermedades que han surgido años atrás.⁵⁶ Los antibióticos son compuestos químicos sintetizados por organismos como bacterias, hongos y actinomicetos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos.⁵⁷ Sin embargo, los antimicrobianos se clasifican en dos grandes grupos, los cuales corresponden a los quimioterápicos y antibióticos.⁵⁸ Los primeros son compuestos producto de la síntesis orgánica como las (Sulfamidas); y los antibióticos, son sustancias sintetizadas por organismos como la (penicilina) o modificaciones artificiales de ellos mismos. Sin embargo, el término antibiótico se ha ampliado para hacer referencia a los compuestos sintéticos.⁵⁸

Un factor importante en la eficacia de un tratamiento infeccioso radica no sólo en alcanzar una concentración bactericida ideal en el sitio de la infección,⁵⁹ sino también que permanezca por debajo de los niveles que son tóxicos para las células del huésped.⁵⁹ Cuando esto se logra, se establece que el microorganismo es sensible.⁵⁹ Por lo tanto, cuando las concentraciones del fármaco son mayores que las empleadas por seguridad para el individuo, se establece que el patógeno es resistente.⁵⁸

6.1 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos, son compuestos que presentan diferentes propiedades fisico-químicas, farmacológicas, de espectro antimicrobiano y mecanismo de acción, características que han permitido clasificarlos; sin embargo, resulta difícil elegir un criterio ideal de agrupación.^{58,60}

6.1.1 Afectación bacteriana. Los antimicrobianos se han agrupado según sus efectos bacterianos en: bactericidas, los cuales efectúan una acción letal sobre el microorganismo y bacteriostáticos que son los que inhiben el crecimiento y multiplicación del patógeno, pero que podría activarse biológicamente si se suspende el tratamiento.⁶¹ Entre los antibióticos con efecto bactericidas se encuentran los que ejercen una acción inhibitoria en la síntesis de la pared bacteriana, alteraciones en el metabolismo del ADN y modificación de membrana celular; y entre los bacteriostáticos están los que interrumpen la síntesis proteica.⁶² Sin embargo, este tipo de clasificación puede variar dependiendo del tipo de microorganismo, mecanismo de acción, tiempo de exposición y fase de crecimiento de la bacteria.^{60,62} Estos factores pueden determinar que un tipo de antibiótico actúe de forma bactericida o bacteriostática.^{60,62} Por ejemplo, los antibióticos betalactámicos son bactericidas sólo en el momento de crecimiento bacterial, debido a que en esta fase hay síntesis del peptidoglucano de la pared celular,⁶¹ mientras que en otros, como en el caso de la penicilina G, actúa como bactericida frente a los cocos grampositivos y como bacteriostático para *Streptococcus faecalis*.⁶⁰

6.1.2 Según el mecanismo de acción

6.1.2.1 Inhibición de la pared celular. Estos tipos de agentes actúan en las diferentes etapas de síntesis de la pared celular, específicamente en la formación del polímero peptidoglucano, siendo más efectivos contra bacterias Gram positivas, debido a que su pared celular presenta mayor cantidad de peptidoglucano que las bacterias Gram negativas.⁶² Estos antibióticos son poco tóxicos y con un alto grado de selectividad, ya que este tipo de polímero es propio de bacterias.⁶² Los antibióticos con este mecanismo de acción son: betalactámicos, fosfomicina, cicloserina, vancomicina, bacitracina, mureidomicinas, valinomicina e inhibidores de betalactamasas.⁶²

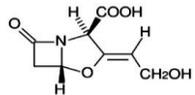
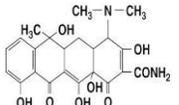
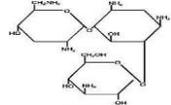
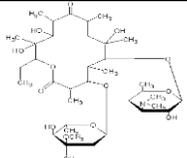
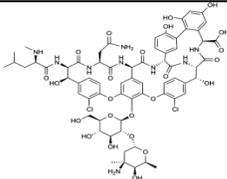
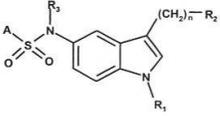
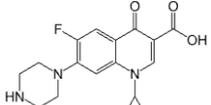
6.1.2.2 Antibióticos activos de membrana citoplasmática. La membrana citoplasmática es una estructura celular muy importante, ya que interviene en muchos procesos de transporte entre el interior de la célula y el medio.⁵⁹ Este tipo de antibiótico tiene como mecanismo de acción el cambio en la permeabilidad, permitiendo la salida de iones potasio, ácidos nucleicos y la entrada de otros elementos que modifican el metabolismo celular.⁵⁹ Estos tipos de antibióticos en su mayoría, son tóxicos para los humanos, debido a que la membrana celular está presente tanto en bacterias y animales.^{60,61} Entre estos tipos de antibióticos están las polimixinas, daptomicina, valinomicina y las tirocidinas.^{60,61}

6.1.2.3 Inhibición de síntesis proteica. Estos tipos de antibióticos actúan inhibiendo la síntesis proteica, debido a que se acoplan al complejo ribosoma-ARNm. Estos compuestos antimicrobianos afectan las diferentes etapas de los procesos de síntesis de proteínas, como: iniciación, elongación y terminación. Estos antibióticos en su mayoría actúan como bacteriostáticos, sin embargo, pueden comportarse como bactericidas dependiendo de la concentración del antibiótico y del tipo de patógeno. Hacen parte de este grupo de antibióticos: aminoglucósidos, tetraciclinas, glicilclinas, anfenicoles, lincosamidas, macrólidos, cetólidos, estreptograminas, mupirocina, oxazolidinonas y el ácido fusídico.^{62,63}

6.1.2.4 Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos. El genoma bacteriano, al igual que en cualquier otro organismo contiene toda la información para la síntesis de proteínas. El mecanismo empleado por estos tipos de antibióticos son: alteración en el proceso de replicación de ADN, inhibiendo la transcripción y la síntesis de metabolitos esenciales. Entre los antibióticos que presentan este mecanismo de acción están: sulfamidas, diaminopirimidinas, rifamicinas, quinolonas, nitroimidazoles, nitrofuranos.^{60,62,63}

6.1.3 Clasificación según sus estructuras químicas. Este tipo de clasificación es la más empleada en la literatura, fundamentándose principalmente en los núcleos base de las estructuras moleculares, las cuales otorgan ciertas similitudes y diferencias fisicoquímicas, así como farmacológicas a los diferentes antibióticos.⁵⁷ En la tabla 1 se señalan las principales características químicas de las diferentes clases de antibióticos.

Tabla 1. Características químicas de las diferentes clases de antibióticos. ^{57, 61, 63-68}

Clase de antibiótico	Composición química general	Estructura química
Betalactámicos	Presencia de un anillo betalactámico. ^{8,58}	
Tetraciclinas	Presenta un sistema de cuatro anillos tetracíclico naftaceno carboxamida, a los que les unen diferentes radicales, formando así diferentes tipos de tetraciclinas. ^{64,65}	
Aminoglucósidos	Presencia de un anillo aminociclitol al que se unen diferentes azúcares. ⁶²	
Macrólidos	Presentan un anillo lactónico, el cual puede variar desde 8 hasta 62 átomos. ⁶⁶	
Glucopéptidos	Son moléculas complejas, con un heptapéptido como estructura central. ⁶⁷	
Sulfonamidas	Se caracterizan por poseer un núcleo de benceno, unido a otro anillo de pirimidina. La adición de átomos de fluor, forman las fluoroquinolonas. ⁶⁸	
Quinolonas	Se caracterizan por presentar un anillo de benceno, unido a otro anillo de pirimidina. La adición de átomos de fluor, forman las fluoroquinolonas. ⁶⁹	

6.2 ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS

El descubrimiento de los antibióticos betalactámicos se remonta a 1929 en un estudio realizado por Alexander Fleming, en el que pudo determinar el poder antimicrobial de una sustancia producida por una especie de hongo del género *Penicillium*,⁷⁰ encontrando que este compuesto era capaz de inhibir el crecimiento de bacterias en diferentes grados, donde las bacterias Gram negativas eran más sensibles en comparación a los cocos Gram positivos.⁷⁰ Esta sustancia más tarde recibió el nombre de “penicilina”.⁷⁰ Sin embargo, su uso en el área clínica no fue de inmediato, debido a que no se realizaron experimentos en animales que comprobaran sus propiedades quimioterapéuticas.⁷¹ No fue sino hasta 1940 cuando se efectuaron los primeros estudios con la penicilina en ratones, en el que se demostró su eficacia antimicrobiana contra bacterias del género *Streptococcus* sp., las cuales estaban asociadas con la gangrena gaseosa.⁷² Años después, se realizó el primer tratamiento usando penicilina en 10 pacientes con infecciones producidas por *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, con resultados exitosos.⁷³

Entre 1940 y 1950 se presentó un importante avance en el área clínica con el descubrimiento de nuevos antibióticos como: estreptomina, cloranfenicol, clortetraciclina, eritromicina, vancomicina.⁷⁴ Sin embargo, sólo existían dos compuestos betalactámicos en uso terapéutico (penicilina G y penicilina V) y el gran auge de los antibióticos betalactámicos comenzaría en 1960 con la síntesis de penicilinas semisintéticas, cefalosporinas sintéticas y demás antibióticos betalactámicos.⁷¹

Un punto importante que permitió la expansión en el campo de los antibióticos betalactámicos, fue la idea de poder modificar la cadena lateral, que es la que determina las propiedades físicoquímicas de la penicilina.⁷¹ Pero no fue hasta 1959 que mediante el proceso de hidrólisis enzimática empleando deacilasas y

usando de la penicilina V como sustrato, se logró eliminar el grupo acilo, quedando el núcleo de la molécula, el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), con un grupo amino libre en un extremo, permitiendo así la unión de nuevas estructuras químicas para la obtención de nuevas penicilinas con una actividad antimicrobial mayor a la de la penicilina G y V.^{71,74} Con el descubrimiento de estos compuestos antimicrobianos se llegó a pensar en el fin de las enfermedades infecciosas; sin embargo, no fue así, ya que muchos de los patógenos han desarrollado resistencia mediante mecanismo adaptativos.⁷⁵

Los antibióticos betalactámicos son una de las familias de antimicrobianos más importantes y numerosas que existe; sin embargo, su extenso uso como tratamiento quimioterapéutico desde 1940, ha ocasionado que la frecuencia de resistencia a estos antibióticos haya aumentando de forma preocupante.⁷⁶ Esto ha estimulado el desarrollo de nuevos antibióticos y estrategias terapéuticas como la combinación de antibióticos,⁷⁷ con el propósito de combatir específicamente algunos agentes de importancia clínica, como las bacterias gram negativas resistentes a metecilina (*Staphylococcus aureus*).⁷⁸

Una de las opciones hasta el momento más viable contra este tipo de patógenos, es la combinación de diferentes clases de antibióticos betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, debido a que el principal mecanismo de defensa de estos microorganismos frente al antibiótico es el rompimiento del anillo betalactámico mediante hidrólisis con enzimas betalactamasas, ocasionando la inactivación de la función antimicrobiana de la molécula.⁷⁹ Se estima que el 70% de las bacterias causantes de enfermedades infecciosas son resistentes al menos a uno de los antimicrobianos más comunes y usados.⁸⁰ Actualmente, existen nuevos antibióticos betalactámicos (cefalosporinas de quinta generación) en las que se encuentran las Ceftarolina y Ceftobiprol, este último ha tenido una efectividad media contra *Staphylococcus aureus* resistentes a metecilina y a patógenos Gram negativos resistentes a la vancomicina.⁷⁸

La resistencia bacteriana no es una problemática actual. En la década del 60, ya habían reportes de resistencia de *Staphylococcus aureus* a la penicilina y posteriormente a la meticilina.^{81,82} Esto permitió el desarrollo de nuevas alternativas farmacéuticas en contra de las enfermedades infecciosas; sin embargo, actualmente el panorama no es muy alentador.⁸³ Por tal razón, instituciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) han diseñado durante varios años estrategias a nivel mundial con el propósito de poder contrarrestar esta amenaza.⁸³

6.2.1 Propiedades químicas y clasificación de los antibióticos betalactámicos. Estos fármacos se caracterizan molecularmente por la presencia de un anillo betalactámico, el cual está constituida por tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno; unidos a esta estructura heterocíclica, están las cadenas laterales constituidas por una variedad de radicales, que son los que determinan las propiedades tóxicas, la sensibilidad a betalactamasas y variaciones del espectro antimicrobiano.⁸⁴ El anillo betalactámico puede unirse a otros anillos o estructuras químicas, permitiendo la formación de los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos como: las penicilinas, cefalosporinas, carbapemenes y los inhibidores de betalactamasas.⁸⁵ Los antibióticos monobactámicos, a diferencia de los demás antibióticos de su clase, no presentan ningún otro anillo asociado al anillo betalactámico.⁸⁶

En la actualidad, las penicilinas y cefalosporinas son los grupos más amplios y de mayor uso clínico (tabla 2). Esto es debido a ciertas características farmacológicas y farmacocinéticas como: su acción bactericida, algunos derivados presentan espectros amplios, buena difusión tisular y absorción oral, así como una baja toxicidad para el organismo,⁸⁷ debido a que estos fármacos se unen a diversas enzimas que están involucradas en los procesos de síntesis del polímero

peptidoglucano de la pared celular de las bacterias, la cual está ausente en las células eucariotas.⁸⁸

6.2.1.1 Penicilinas. Este grupo de antibióticos betalactámicos se caracteriza por presentar un núcleo del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), el cual está conformado por la unión de un anillo tiazolidíco y un anillo betalactámico.⁸⁹ Así mismo, sus propiedades químicas están determinadas por la presencia de una cadena lateral unida en la posición 6 del anillo betalactámico.⁸⁶

6.2.1.2 Cefalosporinas. Entre los antibióticos betalactámicos, las cefalosporinas son las más amplias en cuanto a número y las más comercializadas.⁸⁴ Las cefalosporinas son antibióticos sintéticos provenientes de la cefalosporina C, la cual es producida por el hongo *Cephalosporium acremonium*.⁸⁷ Se diferencia de las penicilinas por la presencia de un anillo dihidrotiazínico que está unido al anillo betalactámico, conformando un núcleo estructural, el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA).^{84,86} Este tipo de compuestos presentan dos cadenas laterales, que al igual que en las penicilinas son las que determinan las propiedades farmacéuticas y farmacocinéticas de la molécula.⁸⁶ Una característica importante es que estos antibióticos presentan un amplio espectro antimicrobial y su efectividad contra las bacterias Gram negativas es mayor que el de las penicilinas.⁵⁷

6.2.1.3 Carbapenémicos. Los carbapenemas son considerados los antibióticos más eficientes para el tratamiento de patógenos multirresistentes, debido a su estabilidad frente a las betalactamasas y a su alto grado de penetración a través de las membranas celulares.⁹⁰ Por tal razón, estos antimicrobianos son considerados como antibióticos de última línea y se utilizan como último recurso en pacientes con serios problemas de infección o cuando los tratamientos con antibióticos comunes no funcionan.⁹¹ Desafortunadamente, se ha encontrado resistencia en algunas cepas de enterobacterias (*Escherichia coli* y *Klebsiella*

pneumoniae) a nivel mundial.⁹²⁻⁹⁴ Los carbapenemas se caracterizan químicamente por la presencia de un anillo pirrolidínico y un radical hidróxilo etilo en la cadena lateral que está unido al anillo betalactámico, a diferencia de las penicilinas y cefalosporinas que presentan un grupo acilamino.⁹¹

6.2.1.4 Monobactámicos. Los antibióticos monobactámicos son compuestos monocíclicos obtenidos de *Chromobacterium violaceum*, una especie de bacteria.⁹⁵ Es un antibiótico empleado contra bacterias aerobias Gram negativas y contra *Pseudomona aeruginosa*.⁵⁷ Este tipo de antibiótico presenta una estructura sencilla, formada por un anillo betalactámico, sin ningún otro anillo unido a él; esta característica lo diferencia químicamente de los demás antibióticos betalactámicos.⁸⁶

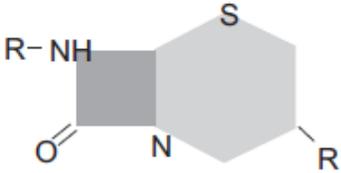
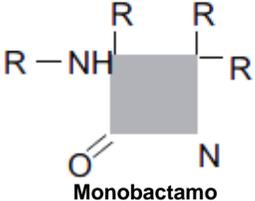
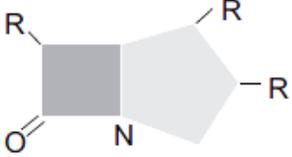
6.2.1.5 Inhibidores de betalactamasas. Uno de los principales mecanismos de resistencia contra los antibióticos betalactámicos lo constituye las betalactamasas,^{96,97} enzimas capaces mediante hidrólisis de romper el anillo betalactámico, ocasionando una inactivación de la molécula.⁹⁷ Una estrategia empleada utilizada para combatir la resistencia contra este tipo de antibióticos, es la combinación de antibióticos betalactámicos e inhibidores de betalactamasas, con el propósito de inactivar las betalactamasas producidas por los patógenos.⁹⁸ Los tres principales, inhibidores de betalactamasas son: ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam, las cuales conservan la estructura química de los betalactámicos.^{97,98} El ácido clavulánico es un derivado del ácido penicilánico sin la presencia de la cadena lateral acilamino en C6 y el cambio del átomo de azufre de la posición tres por un oxígeno, lo que permite una mayor afinidad por las betalactamasas.⁹⁶ El sulbactam y el tazobactam son derivados semisintéticos del ácido penicilánico; su principal diferencia radica en el grupo triazol en posición tres en el tazobactam.^{84,86}

Tabla 2. Clasificación de los antibióticos betalactámicos.^{84, 85, 87, 89}

Antibióticos Betalactámicos	Núcleo estructural del antibiótico
<p>Penicilinas</p> <p>Penicilinas naturales</p> <p>-Penicilina G (bencil) - Penicilina G benzatina -Penicilina G procaína</p> <p>Ácido-resistentes</p> <p>-Penicilina V - Feneticilina Propicilina</p> <p>Resistentes a B-lactamasas (antiestafilocócicas)</p> <p>-Meticilina - Dicloxacilina -Nafcilina - Flucloxacilina -Isoxazolilpenicilinas - Oxacilina -Cloxacilina</p> <p>Aminopenicilinas (amplio espectro)</p> <p>-Ampicilina - Bacampicilina -Metampicilina -Pivampicilina -Talampicilina -Amoxicilina -Hetacilina -Epicilina -Ciclacilina</p> <p>De amplio espectro (antipseudomonas)</p> <p>-Carbenicilina -Carfecilina -Carindacilina -Ticarcilina -Ureidopenicilinas - Azlocilina -Mezlocilina -Apalcilina - Piperacilina</p> <p>Amidinopenicilinas</p> <p>-Mecilinam -Pivmecilinam</p> <p>Resistentes a betalactamasas</p>	<div data-bbox="1068 1192 1323 1348" style="text-align: center;"> </div> <p style="text-align: center;">ácido 6-aminopenicilánico (Anillo betalactámico + Anillo tiazolidínico)</p>

<p>-Temocilina - Ácido clavulánico - Sulbactam - Tazobactam</p>	
---	--

Tabla 2 (Continuación). Clasificación de los antibióticos betalactámicos. ^{84, 85, 87, 89}

<p>Cefalosporinas</p> <p>Primera generación -Cefalotina -Cefaloridina -Cefazolina -Cefapirina -Cefalexina -Cefacetrilo -Cefaloglicina - Cefadroxilo - Cefradina</p> <p>Segunda generación -Cefuroxima -Cefamandol -Cefoxitina -Cefmetazola -Cefaticina - Cefaclor -Cefotiam -Cefonicid -Ceforanida -Cefprozilo</p> <p>Tercera generación -Cefotaxima - Ceftizoxima -Ceftazidima - Moxalactama -Cefsulodina -Cefoperazona - Ceftriaxona -Cefotetána -Cefmenoxima -Cefixima - Cefpodoxima -Ceftibuteno</p> <p>Cuarta generación -Cefepima - Cefpiroma</p> <p>Quinta generación -Ceftarolina - Ceftobiprol</p>	 <p>Ácido 7 -alfa -cefalosporínico (Anillo betalactámico+Anillo dihidrotiazínico)</p>
<p>Monobactámicos</p> <p>- Aztreonam - Carumonam</p>	 <p>Monobactamo</p>
<p>Carbapenemas</p> <p>-Imipenem -Meropenem</p>	 <p>Carbapenema (Anillo betalactámico+ Anillo pirrolínico)</p>
<p>Inhibidores de B-lactamasas</p> <p>-Ácido clavulánico -Sulbactam -Tazobactam</p>	 <p>Clavamo/oxapenamamo (Anillo betalactámico +Anillo oxazolidínico) Ácido clavulánico</p>

6.2.2 Mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos. Las bacterias presentan una gran variación en cuanto forma y hábitats; sin embargo, independientemente estos microorganismos deben garantizar una uniformidad en su forma,⁹⁹ así como una barrera selectiva entre el medio ambiente y su interior, ya que entre estos existe una gran diferencia de osmolaridad, lo que ocasionaría su propia destrucción.¹⁰⁰ La biosíntesis de la pared celular en bacterias es atacada por los antibióticos betalactámicos y consta de tres etapas: fase citoplasmática, transporte de precursores y la organización estructural del peptidoglucano.^{62,99,101}

6.2.2.1 Fase citoplasmática. La primera etapa del proceso de biosíntesis de la pared celular se desarrolla en el citoplasma celular, donde se sintetizan los precursores necesarios en la formación del peptidoglucano como: uridindifosfato-N-acetilglucosamina (UDP-NAG) y el ácido uridindifosfato-N-acetilmurámico (UDP-NAM).¹⁰¹ Posteriormente, se lleva a cabo un proceso de adición por medio de ligasas de una cadena pentapéptida al residuo de ácido murámico.⁶² Esta cadena está conformada por cinco aminoácidos, los cuales pueden variar dependiendo del tipo de bacteria. Generalmente este péptido está constituido por: L-alanina, ácido D-glutámico, ácido mesodiaminomélico o L-lisina en grampositivos y los dos últimos son un dipéptido de D-alanil-D-alanina.^{62,101}

6.2.2.2 Transporte de precursores a través de la membrana. La molécula de UDP-NAM-pentapéptido por medio de una translocasa se transfiere a un transportador lipídico, denominado bactoprenol, el cual facilita el transporte del péptido a través de la membrana.⁶² Una vez formado este complejo, una transferasa suministra el N-acetilglucosamina (NAG) proveniente del UDP-NAG, de esta manera se obtiene una molécula de bactoprenol-NAM (pentapéptido)-NAG. Finalmente, esta molécula es transportada a través de la membrana.¹⁰⁰

6.2.2.3 Organización estructural del peptidoglucano. En esta etapa se lleva a cabo la transglicosilación, separación del bactoprenol y transpeptidación de las

moléculas de bactoprenol-NAM (pentapéptido)-NAG, provenientes del citoplasma.⁹⁹ Estas reacciones son efectuadas por proteínas de membrana, denominadas PBP (proteínas de unión a penicilinas) las cuales interactúan con las moléculas precursoras, permitiendo de esta manera la polimerización o entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglucano.¹⁰¹ Las nuevas cadenas de murina sintetizadas son transportadas a la capa de peptidoglucano existente.¹⁰⁰

Los antibióticos betalactámicos son antimicrobianos que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana.⁵⁷ Estos compuestos actúan específicamente en la última etapa de síntesis del peptidoglucano, ya que interactúan con proteínas ubicadas en la cara externa de la membrana (PBP), las cuales presentan actividades de transglucosilasa, carboxipeptidasa y transpeptidasa, reacciones que permiten el ensamble de las cadenas de peptidoglucano.^{62,100} Los anillos betalactámicos se unen de manera covalente al sitio activo de las PBP con acción transpeptidasa, debido a que su estructura es similar al dipéptido (D-alanila-D-alanina) de la molécula precursora UDP-NAM-pentapéptido.^{62,87,100} Sin embargo, para que la acción del antibiótico sea activa, debe existir un acceso del fármaco a las PBP de la membrana celular y una interacción receptor- antibiótico.⁸⁶ Para que los antibióticos betalactámicos presenten una acción antimicrobiana, es necesario que la bacteria se encuentre en crecimiento, de lo contrario los microorganismos no son susceptibles al antibiótico.^{87,100}

7. IMPACTO ECOLÓGICO DE LOS ANTIBIÓTICOS

Al igual que muchos otros fármacos, los antibióticos son moléculas activas biológicamente, usados extensamente para el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos, animales, agricultura y también a nivel industrial.⁵⁰ Sin embargo, la mayoría de los antibióticos no son completamente metabolizados por los individuos tratados y cerca de un 80% del antibiótico (incluyendo metabolitos) son excretados en la orina y las heces, a las fuentes receptoras en el ambiente.¹⁰² Además, se ha encontrado que ciertos antibióticos como penicilinas (ampicilina, amoxicilina), cefalosporinas, eritromicina (macrólido), tetraciclinas y sulfametoxazol (sulfonamida), no son biodegradados.¹⁰³ Aunque la vida media de muchos otros antibióticos es corta, el alto consumo de estos fármacos permite que exista una continua introducción al medio, convirtiéndolos en moléculas persistentes.⁵⁵ Por lo tanto, la biota acuática está expuesta de manera constante a diferentes tipos de antimicrobianos.¹⁰⁴ Estos compuestos en la naturaleza pueden actuar de forma sinérgica entre diferentes antimicrobianos, fármacos o cualquier sustancia química presente, lo que aumentaría aún más los efectos tóxicos sobre la biota.^{104,105}

7.1 ECOTOXICIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA BIOTA ACUÁTICA

La principal preocupación de los antibióticos como contaminantes emergentes esta en desarrollo de resistencia antimicrobiana y su efecto en la salud humana.¹⁰⁶ Sin embargo, muchos otros organismos que son componentes importantes del ecosistema no han recibido mucha atención, como el fitoplancton, zooplancton y las macrófitas, las cuales son una parte muy importante de la biomasa en el planeta¹⁰⁷; debido a las muchas funciones que prestan como productores primarios, biodegradación de la materia y ciclo de nutrientes.^{108,109}

De manera general, los principales grupos de organismos afectados significativamente por los antibióticos, corresponden a bacterias, hongos y microalgas.¹⁰² Investigaciones toxicológicas han demostrado una variedad en la susceptibilidad entre las cianobacterias, algas y plantas acuáticas, siendo las algas verde-azules las más sensibles a los antibióticos.¹¹⁰⁻¹¹³ Sin embargo, existen organismos acuáticos que no presentan efectos negativos como peces, anélidos, anfibios y algunas especies de crustáceos (*Gammarus fossarum* y *Gammarus pulex*).^{102,113-115}

7.2 ECOTOXICIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS

Un estudio ecotoxicológico realizado para evaluar la toxicidad de la amoxicilina (antibiótico betalactámico) en individuos del género *Synechocystis* sp. (Cianobacteria), encontró un efecto tóxico para estos organismos, debido a que interfiere en el transporte de electrones en la fase II de la fotosíntesis, ocasionando una inhibición del crecimiento.¹⁰³ Resultados similares fueron encontrados por Holten *et al.* en un estudio en el que evaluó la toxicidad de amoxicilina (betalactámico), flumequina, ácido oxolínico (quinolonas), clorhidrato de oxitetraciclina, clorhidrato de sarafloxacin (tetraciclinas), sulfadiazina y trimetoprim (sulfonamidas), en *Microcystis aeruginosa* (cianobacteria), *Selenastrum capricornutum* (alga de agua dulce) y *Rhodomonas salina* (alga de marina)¹¹⁰. En este trabajo se encontró que el antibiótico betalactámico (amoxicilina) es fitotóxico para *Microcystis aeruginosa* y *Selenastrum capricornutum* con valores de CE 3,7 ug/L y 250 mg/L, respectivamente. Todos los antibióticos evaluados interfieren en el proceso de síntesis de pigmentos fotosintéticos, ocasionando que la tasa fotosintética y de crecimiento disminuya, en diferentes grados dependiendo del tipo de antibiótico.¹¹⁰ Sin embargo, el efecto

fitotóxico de los antibióticos betalactámicos puede variar dependiendo de la especie.¹⁰³

Esta diferencia de la toxicidad que tienen los antibióticos sobre las especies, esta relacionada con la genómica del individuo y el mecanismo de acción del antimicrobiano.¹¹² Un estudio realizado por Kvíderová y Henley, demostró que la ampicilina no afecta ni la fotosíntesis y ni el crecimiento de *Picochlorum oklahomensis* y *Dunaliella sp.* (algas verdes);¹¹⁶ estos mismo resultados fueron encontrados para *Lemna gibba* (macrófita) en el que se evaluó la toxicidad de 25 antibióticos, de los cuales 22 se han encontrado en el ambiente. Dentro de los antibióticos betalactámicos evaluados están: cephalexin (grupo carbapenemas) y penicilina (grupo penicilinas).¹¹⁷ En este estudio se demostró que los antibióticos betalactámicos, así como macrólidos, aminoglucósidos y lincosamidas, no mostraron ningún efecto adverso para esta especie de planta, ni en la biomasa ni en el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y carotenos).¹¹⁷ Sin embargo, antibióticos como fluoroquinolonas, sulfonamidas y las tetraciclinas fueron los que presentaron un efecto fitotóxico significativo para *L. gibba*.¹¹⁷ Otros estudios han demostrado una alta toxicidad de estos compuestos en algas, micro invertebrados, macrófita y plantas.^{111, 118–121}

7.3 EFECTOS TOXICOLÓGICOS DE LOS ANTIBIÓTICOS Y SU RELACIÓN CON LAS ESPECIES

Los fármacos son sustancias sintetizadas que tienen como propósito efectuar alguna acción específica en los humanos.⁵⁰ Al tratarse de moléculas biológicamente activas estas pueden interactuar de manera benéfica o adversa en un organismo no diana, si este presenta receptores o rutas metabólicas similares al del organismo diana.¹²²

Los estudios moleculares y filogénicos han sido herramientas importantes para reflejar y entender la evolución de los genomas.¹²³ La complejidad estructural de las células eucariotas ha llevado a pensar que estas células han evolucionado de ancestros procariotas mediante la captura endosimbiótica por parte de las eucariotas.¹²⁴ Estudios moleculares han demostrado que estructuras celulares como los cloroplastos y mitocondrias están relacionados genéticamente con organismos procariotas.¹²⁴

Los cloroplastos son estructuras que presentan dos membranas celulares, su genoma es circular de doble cadena como en bacterias y presenta un sistema de replicación, transcripción y traducción parecido al de las procariotas.^{125,126} Por su parte, las mitocondrias están delimitadas por dos membranas, son organelos autónomos con su propio genoma circular de doble cadena (como en humanos),¹²⁷ los procesos respiratorios son parecidos a los de las bacterias y sintetiza RNA ribosomal, RNA de transferencia y ribosomal de tipo bacteriano implicados en la síntesis de proteínas.¹²⁸ Esta conservación de genes que codifican proteínas y enzimas pueden ser blanco de los fármacos, por lo que en organismos no diana pueden presentar inhibición de ciertos procesos metabólicos.¹¹²

7.3.1 Antibióticos betalactámicos. El mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos consiste en la inhibición de la polimerización del peptidoglucano, mediante la unión a PBP con actividad transpeptidasa de la membrana celular,^{62,86,100} ocasionando el debilitamiento de la pared celular y su posterior rompimiento debido a la diferencia de osmolaridad del medio y el interior de la célula.⁶² Estos antibióticos mostraron ser tóxicos para las cianobacterias (algas verde-azules), pero no para el resto de las algas y macrófitas. Esta importante diferencia radica en que las cianobacterias presentan una pared celular formada por una capa de peptidoglucano y la presencia de carotenoides en su membrana externa.¹²⁹ Estudios realizados han demostrado la presencia de PBPs en 12

genomas de cianobacterias, indicando su importancia en la síntesis de la pared celular al momento de la división celular.¹²⁹ Algunas PBPs mostraron una similitud funcional en procesos de transpeptidación, elongación y división celular a las encontradas en *Escherichia coli*.¹²⁹

A pesar de que se han encontrado genes que codifican peptidoglucano en plantas (*Arabidopsis thaliana*) y musgos,^{130,131} no existe tal estructura en el cloroplasto, por lo tanto, los antibióticos betalactámicos no causan ningún efecto sobre la división del plastidio, ni de las células.¹³⁰ Un estudio realizado por Machida *et al.*, determinó la presencia de nueve genes en el cloroplasto relacionados con la síntesis de peptidoglucano en la especie de musgo, *Physcomitrella patens*.¹³⁰ La existencia de genes codificantes de peptidoglucano en células eucariotas, sirve como argumento para apoyar la evolución del cloroplasto a partir de una cianobacteria ancestral (teoría endosimbiótica).¹³²

7.3.2 Otros antibióticos: quinolonas, tetraciclinas, macrólidos y aminoglucósidos. Las quinolonas son antibióticos que se caracterizan por inhibir los procesos de síntesis del ADN, mediante uniones a las topoisomerasas, las cuales son enzimas capaces de cortar, abrir y unir las moléculas de ADN para permitir su replicación y transcripción.¹⁰⁰ Las proteínas que controlan la topología del ADN nuclear en células eucariotas y bacterias son diferentes.¹³³ Las células eucariotas presentan proteínas denominadas histonas que permiten el enrollamiento del ADN nuclear, mientras que en procariontes este tipo de proteínas está ausente y son las topoisomerasas las que cumplen la función de empaquetamiento del ADN.¹³³ Sin embargo, se ha demostrado que las mitocondrias y cloroplastos de las células eucariotas, organizan de manera diferente su ADN; estos organelos no presentan histonas al igual que en bacterias, por lo que utilizan enzimas topoisomerasas para la organización de su material genómico.¹³³ Estudios en diversos grupos de organismo (plantas, algas,

cianobacterias y macroinvertebrados) han demostrado el efecto tóxico de estos antibióticos.^{106,108,117,118}

Otros antibióticos como tetraciclinas, macrólido y aminoglucósidos han demostrado ser compuestos con capacidad tóxica para los organismos.^{106,117} Lo anterior está fundamentado en la similitud de algunos receptores encontrados en los organismos no diana con los encontrados en las células bacterianas, como proteínas de transporte, enzimas y rutas de metabólicas.¹²² Por ejemplo, se ha determinado que los cloroplastos y mitocondrias presentan su propio genoma, así como sistemas propios de transcripción y de traducción para la síntesis de proteínas, los cuales presentan una alta homología a las encontradas en las bacterias.^{112,134}

8. RESISTENCIA BACTERIANA

Los antibióticos además de ser compuestos tóxicos para muchos organismos, son los causantes del acelerado desarrollo de genes de resistencia y de bacterias resistentes a los antibióticos, por lo que han llegado a ser considerados una gran amenaza a nivel mundial para la salud humana y para el medio ambiente,¹³⁵ como lo demuestra el aumento significativo de estudios sobre resistencia bacteriana a los antibióticos durante los últimos años, así como su importancia en el área de la medicina (Gráficas 3 y 4).

Figura 3. Número de publicaciones sobre resistencia bacteriana desde 1975 a la fecha. (Fuente: www.scopus.com)

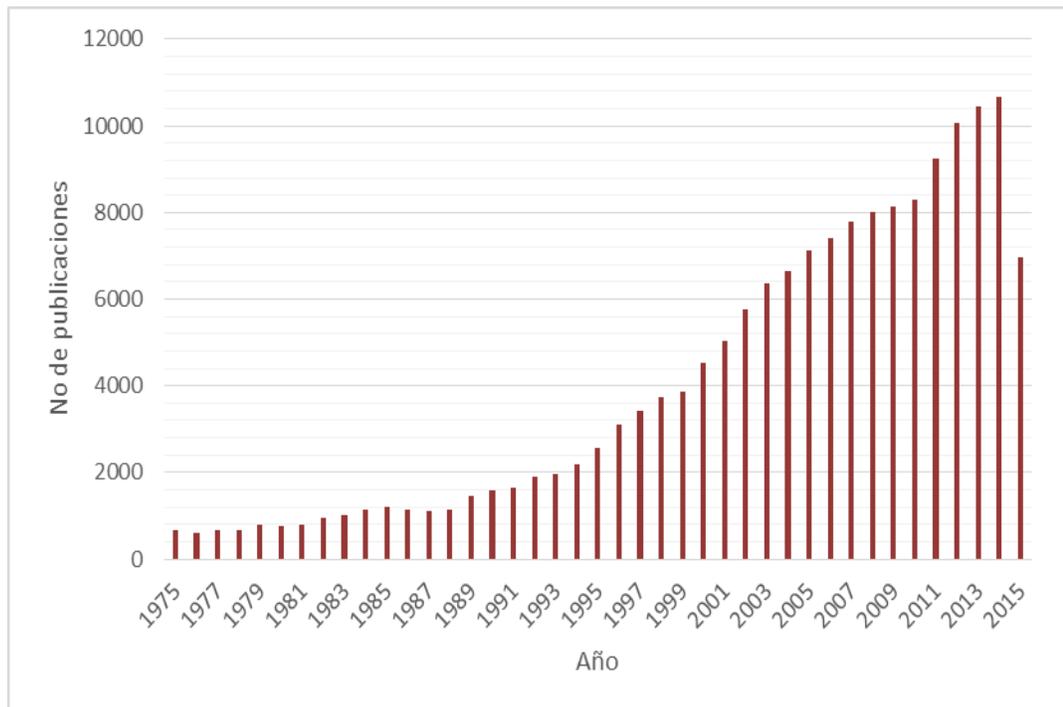
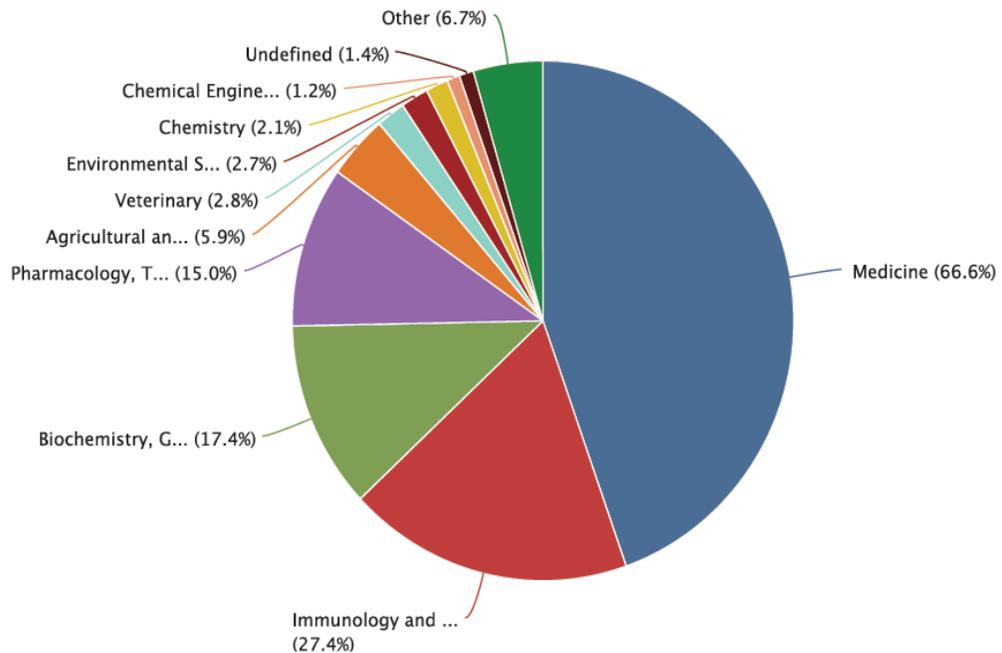


Figura 4. Porcentaje de trabajos realizados sobre resistencia bacteriana por área técnica de estudio. (Fuente: www.scopus.com)



Las aguas superficiales actualmente, son consideradas un gran reservorio de resistencia a los antibióticos, debido a que muchos de estos compuestos son excretados por animales y humanos a las aguas residuales, las cuales entran a receptores hídricos en la naturaleza, sin ningún tipo de control.¹³⁶ Los ecosistemas acuáticos por lo tanto, pueden actuar como medio de difusión y como amplificadores de los genes de resistencia, permitiendo su fácil intercambio por medio de la transferencia de elementos genéticos móviles (plásmidos) entre las bacterias patógenas y las bacterias ambientales.³⁴ Un estudio realizado por Dantas *et al.*, 2008,¹³⁷ determinó el desarrollo de cepas bacterianas capaces de crecer en presencia de 13 tipos de antibióticos de origen natural y sintético, como única fuente de carbono. Sin embargo, lo más sorprendente fue la estrecha

relación filogenética que presentan estas bacterias ambientales con las bacterias patógenas del hombre.¹³⁷

La resistencia a los antibióticos según la organización mundial de la salud (OMS), es definida como un “proceso biológico natural, que mediante mutación o intercambios genéticos, le permite a las especies bacterianas reproducirse en presencia de altas concentraciones de antibióticos a las suministradas a los pacientes en un tratamiento”.⁶ Recientes estudios en filogenia han sugerido que la resistencia bacteriana es un fenómeno con una gran historia, la cual ha venido ocurriendo desde hace millones de años atrás.^{76,138} Por lo tanto, se considera que la resistencia a los antibióticos es una característica natural de las bacterias, las cuales pueden estar presentes en ambientes de bajo o nulo impacto antropogénico (glaciales, aguas subterráneas).^{139,140}

9. CONTAMINACIÓN EMERGENTE: GENES DE RESISTENCIA BACTERIANA

Los genes de resistencia a los antibióticos presentes en los patógenos son el producto de la transferencia de elementos móviles genéticos a partir de bacterias ambientales presentes en los ecosistemas,¹⁴¹ por lo que el primer paso para la adquisición de resistencia es el contacto de un patógeno con un microorganismo ambiental o ADN (plásmidos, transposones e integrones).¹⁴²

Algunos estudios han permitido determinar que los microorganismos ecosistémicos, presentan una variedad de genes a la resistencia, esto no debe ser interpretado como producto de una posible contaminación, más bien como un evento normal en la naturaleza.¹⁴³ Sin embargo, cuando la concentración de bacterias resistentes aumenta más de lo normal, se considera que existe un evento de contaminación y puede suceder por la presencia de genes de resistencia o por la alta concentración de antibióticos que permite que exista una selección de bacterias con resistencia intrínseca (resistencia natural) o mutantes resistentes, sin la presencia de determinantes de resistencia.¹³⁸

Existen dos escenarios diferentes para considerar a los genes de resistencia como contaminantes.¹⁴⁴ El primero, es cuando hay una presión de los antibióticos en el medio, ocasionando la selección de un determinante específico que le permita a los microorganismos sobrevivir, provocando que estos genes sean integrados en los plásmidos, para su posterior difusión entre diferentes especies de bacterias presentes en el medio que están bajo presión selectiva.¹⁴⁴ El segundo escenario, se debe al vertido de residuos hospitalarios, agrícolas, aguas residuales domésticas e industriales, las cuales contienen diversas bacterias patógenas que portan determinantes de resistencia a los antibióticos.¹⁴⁴

Una diferencia importante entre estos dos mecanismos de contaminación radica en su rango de dispersión, ya que los vertidos de las actividades antrópicas son localizadas, en comparación a la contaminación por determinantes de resistencia, los cuales no son dependientes de la liberación continua de los antibióticos, por lo cual una vez estos genes se encuentran en el ambiente, pueden propagarse entre los diferentes ecosistemas, incluso en lugares donde no existe una presión antropogénica.^{9,144} Esta amplia distribución en los ecosistemas acuáticos y terrestres, incluyendo aguas residuales, sedimentos, agua potable y aguas subterráneas, ha permitido que estos genes de resistencia sean considerados los responsables de la gran problemática en la salud a nivel mundial, la resistencia a los antimicrobianos.⁷

La ausencia de estos determinantes de resistencia en los sistemas acuáticos es casi nula, excepto para sitios muy aislados de la geografía como en los nacimientos de aguas en la alta montaña;¹⁴⁵ sin embargo, estudios realizados en Italia y Portugal en aguas embotelladas de manantial, detectaron bacterias de los géneros *Bosea*, *Variovorax*, *Pedobacter* y *Pseudomonas* que eran resistentes a diferentes clases de antibióticos;^{146,147} estos y otros estudios han permitido dimensionar el gran impacto que han tenido los determinantes de resistencia a los antibióticos a nivel mundial. Algunos trabajos indican que en áreas tan remotas de las actividades humanas como zonas de glacial (Ártico, Alaska, Asia central, América del Sur y del Norte y África) se han identificado una variedad de genes de resistencia a fármacos como betalactámicos, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos y glucopéptidos, los cuales también han sido determinados en áreas industriales, agrícolas, clínicas y domésticas.^{139,148} Cabe resaltar que la única área sin presencia de estos determinantes de resistencia es la Antártida, debido a que es una zona aislada de las demás áreas terrestres.^{139,148} Lo anterior permite establecer que uno de los principales problemas es la gran persistencia de los genes de resistencia en el medio ambiente, incluso cuando la presión ha desaparecido.¹⁴⁹

10. EFECTOS DE LOS GENES DE RESISTENCIA EN EL ECOSISTEMA

La continua introducción de antibióticos al medio ambiente ha ocasionado impactos importantes en las comunidades microbianas como: pérdida de especies con funciones ecológicas en la producción de biomasa y en el ciclo de nutrientes;¹⁵⁰ aumento de la concentración de especies patógenas, debido a su mejor adaptabilidad y obtención de recursos⁹ y por último, el surgimiento de nuevas cepas resistentes y el intercambio de material genético entre diferentes especies de microorganismos;³⁴ sin embargo, estudios han demostrado que la incorporación de genes de resistencia por las especies de bacterias naturales y patógenas, ocasiona cambios fisiológicos importantes.⁹

Según Giraud *et al.*, al adicionarse elementos genéticos para la adquisición de resistencia por parte de una bacteria, puede ocasionar un costo biológico, que implicaría cambios metabólicos y fisiológicos importantes para sobrevivir y reproducirse.¹⁵¹ En su estudio, este autor encontró que individuos de *Salmonella typhumurium* resistentes a las quinolonas, presentaban alteraciones en las girasas y cambios en su morfología, debido a que estas proteínas están implicadas en la replicación del ADN.¹⁵¹

Estos cambios en la biodiversidad de los microorganismos pueden afectar de forma directa o indirecta a otros grupos de organismos, debido a que permite el surgimiento de enfermedades en la fauna silvestre, incluyendo humanos.¹⁵² Una evidencia importante de cómo la alteración de la micro biota puede causar enfermedades en animales silvestres, se encontró en un estudio realizado en especies de salamandras y su patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*, una especie de hongo dulceacuícola, causante de una enfermedad propia de anfibios, denominada quitridiomycosis, la cual es la principal causante de la disminución de las poblaciones de anfibios en el mundo.¹⁵³ En este trabajo se determinó una gran

diversidad de géneros de bacterias en la piel de estos anfibios, como *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Pedobacter*, todas con capacidad de inhibir el crecimiento de este patógeno en las células epidérmicas.¹⁵³ Sin embargo, esta problemática se ha agudizado debido a la eliminación de estos microorganismos por la contaminación con agentes antimicrobianos.¹⁵³

Algunos otros ejemplos han demostrado la importante relación que existe entre los microorganismos ambientales y la salud. La existencia de una co-evolución entre los animales y las bacterias, no es un acontecimiento nuevo, lo cual se ha podido evidenciar en la gran relación que existe entre la micro biota humana y la de los demás mamíferos, lo que ha llevado a pensar en una posible evolución convergente.¹⁵⁴ Por lo tanto, la biota bacteriana del tracto gastrointestinal, vaginal, y sistema urinario en humanos, juegan un papel importante en algunos procesos metabólicos, absorción, inmunológicos y de protección frente invasores patógenos; sin embargo, este equilibrio se ve alterado por el consumo de antibióticos, provocando que el sistema en general sea propenso a enfermedades e invasiones de bacterias patógenas oportunistas.¹⁵⁵

10.1 FAUNA SILVESTRE COMO RESERVORIOS DE GENES DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

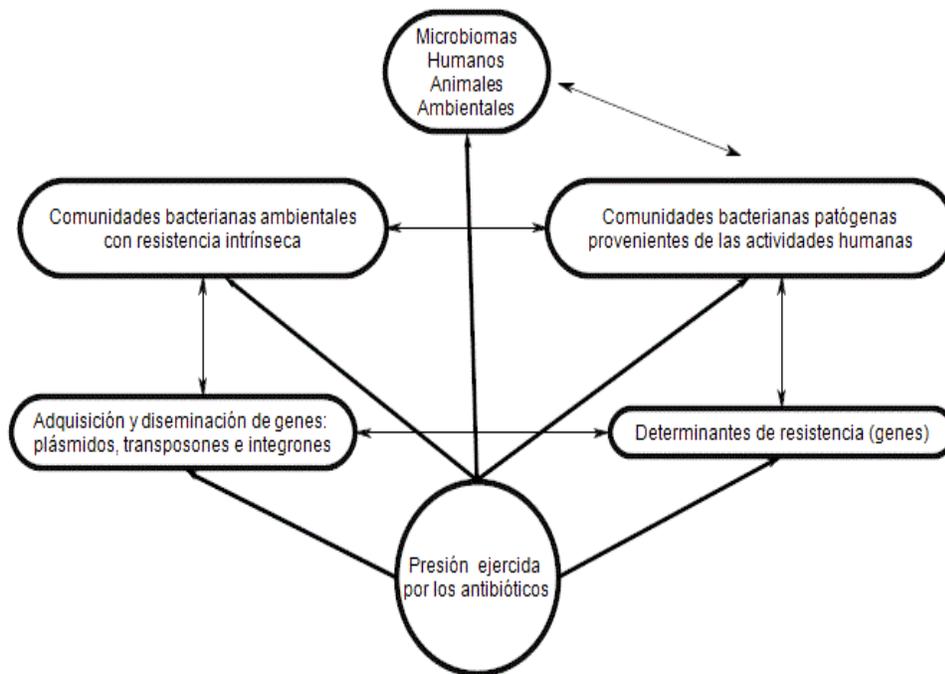
Otro problema importante de este tipo de contaminantes es la transferencia de genes de resistencia entre diferentes grupos de organismos.^{9,141} El intercambio de bacterias patógenas resistentes puede ocurrir de manera directa por contacto con cuerpos de aguas o de manera indirecta por el contacto con bacterias ambientales resistentes, que posteriormente transfieren sus genes a los patógenos de los humanos y animales.¹⁵⁶ Por lo tanto, los sistemas acuáticos además de ser importantes reservorios de bacterias resistentes y genes de resistencia, son

también un importante vehículo de difusión entre diferentes ecosistemas.¹⁵⁶ Estos sistemas acuíferos son considerados fuentes importantes para la evolución y el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia en bacterias.¹⁴²

Algunos trabajos han demostrado la presencia de genes de amplio espectro de betalactamasas en la flora microbiana de especies de consumo humano. Esto puede ser un grave problema debido a que estos microorganismos pueden actuar como reservorios y a su vez ocasionar graves problemas de salud.¹⁵⁷ La persistencia de los genes de resistencia a los antibióticos en el ambiente y en las poblaciones silvestres es alta, incluso en ausencia de presión selectiva por antimicrobianos o por la actividad antrópica, lo cual ha generado incertidumbre en la comunidad científica.^{141,149}

La elevada tasa de resistencia adquirida ha sido identificada en bacterias aisladas en humanos y animales silvestres que no han estado expuestos a estos fármacos y que viven en áreas muy remotas.¹⁵⁸ Algunos estudios han reportado la presencia de *Escherichia coli* con genes de resistencia similares a los detectados en los seres humanos, en muestras de excremento de *Conolophus pallidus*, una de las tres especies de iguanas endémicas de las islas galápagos.¹⁵⁹ Este importante hallazgo refleja que incluso ecosistemas tan aislados son susceptibles a este tipo de contaminantes.¹⁵⁹ Un estudio realizado por Costa *et al.*, en la Península Ibérica, determinó la presencia de un alto número de genes implicados en la resistencia a diferentes tipos de antibióticos (betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, sulfonamidas entre otros) en animales salvajes (aves, mamíferos, reptiles marinos y anfibios), encontrando una variación en la distribución de ciertos tipos de genes de resistencia entre los diferentes ecosistemas.¹⁶⁰ En la Gráfica 5, se muestra de manera simplificada las relaciones entre las diferentes rutas en la adquisición y difusión de la resistencia, así como sus efectos en los ecosistemas.

Figura 5. Rutas y factores implicados en la resistencia y su diseminación. ^{34, 133, 138, 139, 141, 153}



10.2 PROBLEMÁTICA DE LOS DETERMINANTES DE RESISTENCIA A LOS BETALACTÁMICOS – LAS BETALACTAMASAS

En las últimas décadas el fenómeno de la resistencia a los antibióticos a nivel mundial ha aumentado de forma alarmante, por tal motivo, la organización mundial de la salud en 1999 lo catalogó como un problema de salud pública.³⁸

Dentro de los diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos, la producción de enzimas betalactamasas son las más destacadas.¹⁶¹ Además, se considera que los genes que codifican este tipo de enzimas son los más ampliamente distribuidos a nivel mundial.¹² Las betalactamasas son el principal mecanismo de resistencia frente a los antibióticos betalactámicos, los cuales son

uno de los grupos de antimicrobianos más importantes y usados contra las enfermedades infecciosas en humanos y animales.¹⁶² En la actualidad existen descritas más de 400 diferentes tipos de betalactamasas, en las cuales se conserva su mecanismo de acción, pero varían en el tipo de sustrato y a la sensibilidad de los compuestos inhibitorios.¹⁶²

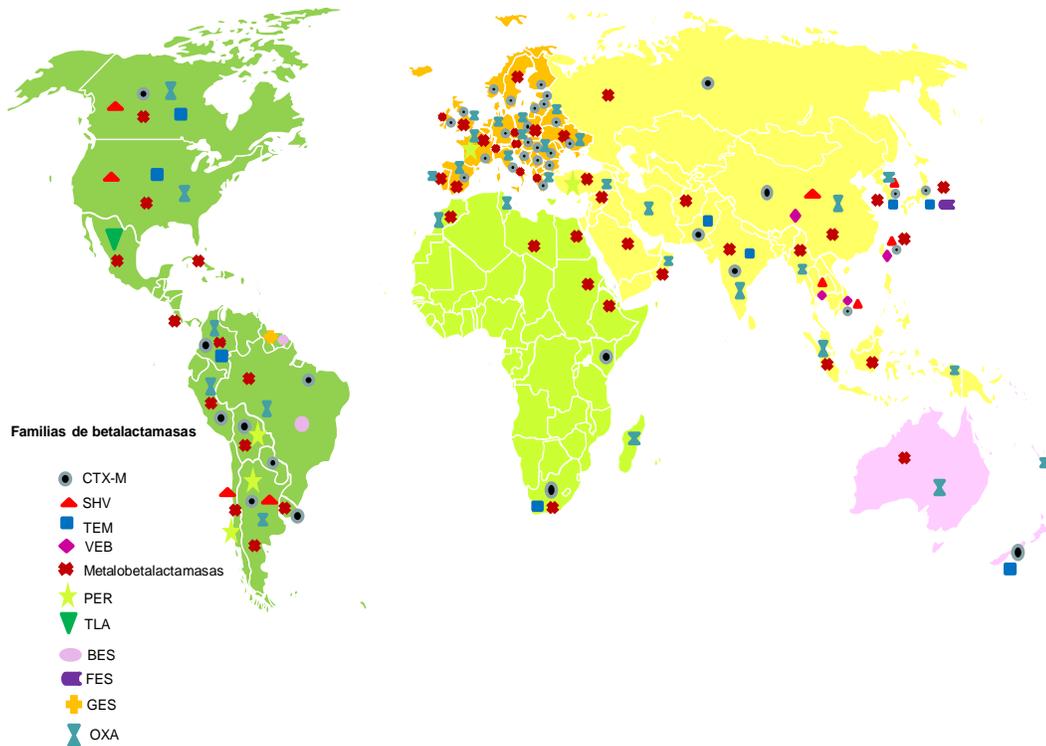
Estas enzimas se caracterizan por presentar la capacidad de romper el anillo betalactámico de los antibióticos betalactámicos, inactivando de esta manera la molécula.¹⁶³ Las betalactamasas se dividen en cuatro clases desde la A a la D. Esta agrupación está mediada por la composición aminoacídica del centro activo catalítico, donde las clases A, C, D presentan un residuo de serina, mientras la clase B requiere de zinc como cofactor para la actividad catalítica, por lo que se conoce como metalobetalactamasas.¹⁶⁴

La clase A está conformada por dos familias, las TEM-1 y SHV-1, este tipo de enzimas sólo hidrolizan penicilinas;¹⁶³ sin embargo, con el posterior uso de las cefalosporinas en la década de los ochenta, se encontraron betalactamasas con mutaciones en la composición de los residuos de los tres aminoácidos del centro activo de la molécula, lo que le otorgó la nueva propiedad de hidrolizar todas las generaciones de cefalosporinas¹⁶³ y monobactámicos;¹⁶⁵ a este tipo de enzimas se les denominó betalactamasas de espectro extendido (BLEE).¹⁶⁵ Este grupo está conformado por las variantes de la clase A (TEM y SHV), las CTX-M y la clase D (OXA).³⁰ La clase B (metalobetalactamasas) posee la propiedad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas; este grupo está conformado por diez grupos: VIM, IMP, GIM, SPM, SIM, NDM, TMB, AIM, KHM y DIM, siendo las dos primeras las más ampliamente distribuidas en el mundo.¹⁶⁶

La gran presión generada por el uso de antimicrobianos a nivel mundial en hospitales, uso veterinario, agricultura, han sido considerados los principales responsables de la crisis y la expansión de resistencia a los antibióticos,¹⁵⁸

(Gráfica 6). Sin embargo, se ha determinado que la adquisición de resistencia puede suceder en lugares remotos y en animales silvestres que no han sido expuestos a ninguna clase de antibiótico.¹⁵⁸

Figura 6. Distribución de las principales familias de betalactamasas a nivel mundial.^{161, 180–183,245}



En las bacterias Gram negativas, el principal mecanismo de resistencia contra los antibióticos betalactámicos son las betalactamasas.¹⁶⁷ En los últimos años, el aumento de bacterias multirresistentes se ha convertido en un problema para los tratamientos infecciosos en el mundo.¹⁶⁷ Uno de los principales agentes patógenos ha sido *Escherichia coli*, la cual se ha considerado una fuente importante de genes de resistencia.¹⁶⁸ Esta especie se encuentra en el tracto digestivo en humanos, mamíferos, aves y en el ambiente, por lo que las aguas contaminadas con heces fecales son el mayor reservorio y el principal medio de difusión de

bacterias y determinantes a la resistencia en general.¹⁶² Las betalactamasas son codificadas por genes ubicados en los plásmidos, por lo que son fácilmente transmitidos entre las diferentes especies e incluso géneros.¹⁶⁸

Los plásmidos son moléculas de ADN extra cromosómico con replicación autónoma y son el principal evento de transferencia horizontal de ADN.¹⁶⁹ Algunos trabajos han permitido demostrar la importancia de este mecanismo en la diseminación de genes que codifican betalactamasas a nivel mundial.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Uno de los principales plásmidos asociados a diferentes casos de enfermedades en el mundo ha sido el IncL/M, este replicón es un importante difusor de resistencia a los betalactámicos, ya que lleva genes que codifican 12 diferentes tipos de betalactamasas, pertenecientes a las clases A,B,C y D.¹⁶⁹

Actualmente, se ha demostrado la gran amenaza que significa para el hombre la introducción de agentes patógenos resistentes en la cadena trófica, los cuales repercuten en la salud no sólo del ser humano, sino de toda la fauna en general.¹⁷²⁻¹⁷⁴ Esto ha incentivado al aumento de estudios en la determinación de genes de resistencia y de bacterias patógenas resistentes en animales de consumo humano y domésticos como aves de corral, salmón, cerdos, ganado, perros, gatos entre otros; todos estos estudios han determinado la presencia de bacterias patógenas con genes que codifican betalactamasas tanto en el hombre como en los animales.^{162,171,175-181} Otros trabajos han permitido reflejar la preocupante dispersión de estos determinantes de resistencia en bacterias procedentes del ser humano, encontrando que algunas betalactamasas se encuentran confinadas a regiones geográficas específicas (endémicas) y otras están ampliamente dispersas por el planeta.^{163,164,166,167,170,180,182-186}

Basados en el reporte de la organización mundial de la salud de 2014, en el cual se recopila la información suministrada por los países miembros, programas de vigilancia y artículos científicos, se ha intentado describir la situación actual de la

resistencia bacteriana a nivel global.⁶ Sin embargo, existen grandes vacíos en la información para ciertos países, debido a que actualmente no existen programas de vigilancia, como por ejemplo en el continente africano donde hay escasez de datos confiables para muchas enfermedades infecciosas comunes y graves para la salud humana.⁶

Este documento de la OMS contiene la información de los principales patógenos a nivel mundial, debido a que son los causantes más comunes de enfermedades infecciosas en la comunidad y hospitales.⁶ En esta lista se incluyen: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, ambas resistentes a cefalosporinas de tercera generación y a carbapenémicos, su mecanismo de resistencia es mediante betalactamasas (Gráficas 7 y 8); *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, son resistentes a los antibióticos betalactámicos; *Neisseria gonorrhoeae* es una especie resistente a cefalosporinas de tercera generación; *Nontyphoidal salmonella* y *Shigella sp.* son resistentes a las fluoroquinolonas.⁶

Figura 7. Resistencia de *Escherichia coli* a cefalosporinas de tercera generación.

6

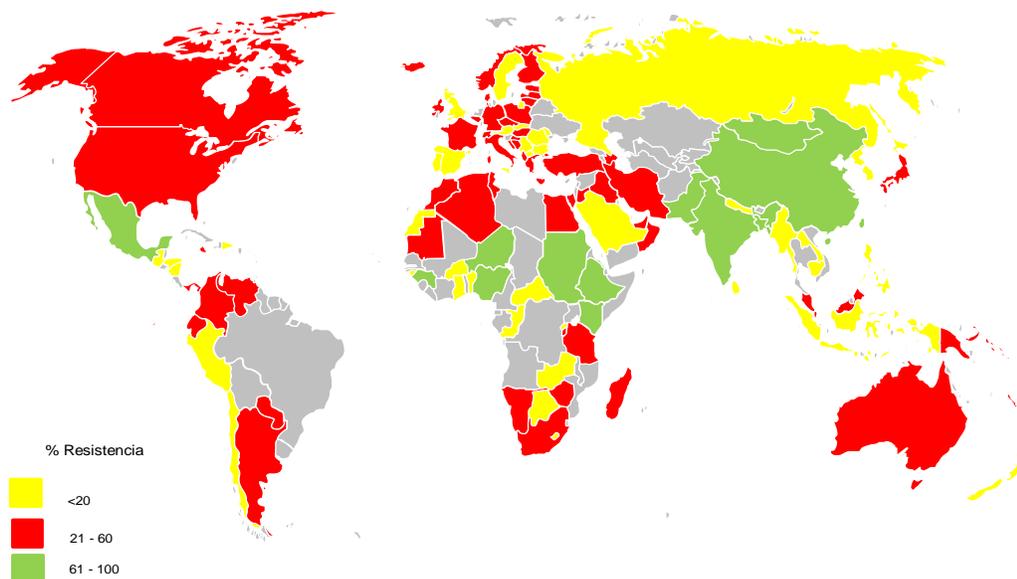
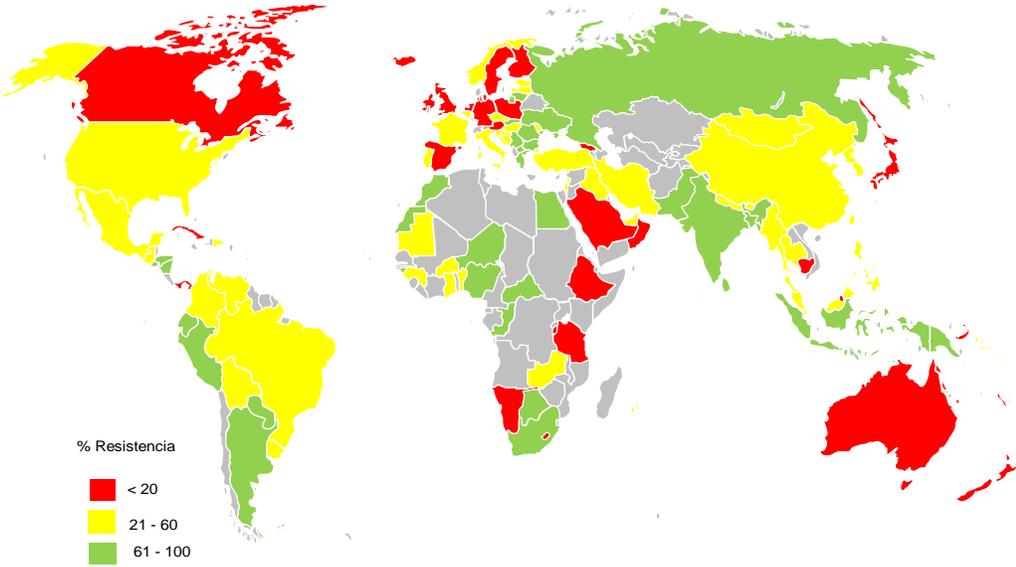


Figura 8. Resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a cefalosporinas de tercera generación.⁶



11. BASES GENÉTICAS DE LA RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana a los antibióticos puede ser intrínseca o natural y hace referencia a características biológicas de cada especie bacteriana, que le confiere la capacidad de resistir la acción de un antibiotico, sin ninguna alteración genética adicional.¹⁸⁷ Algunas bacterias Gram negativas son resistentes innatos a muchos compuestos, debido a la dificultad de los antibióticos para cruzar la membrana externa; un ejemplo es la vancomicina (betalactámico), por lo que este antimicrobiano es efectivo contra bacterias Gram positivas.¹⁸⁸ Un ejemplo importante de resistencia natural se ha evidenciado en *Pseudomonas aeruginosa*, una especie Gram negativa de importancia clínica, debido a que se considera que es la causante entre el 9-10% de las infecciones adquiridas en los hospitales en el mundo.¹⁸⁹ Este microorganismo presenta varios mecanismos de resistencia como disminución de la permeabilidad de la membrana externa, sistemas de bombas salida y síntesis de betalactamasas.¹⁸⁹ Por otro lado, la resistencia adquirida es el resultado de la adquisición de genes exógenos por diferentes mecanismos de dispersión como plásmidos, transposones, integrones y ADN de bacterias muertas.¹⁹⁰ Este fenómeno de transferencia genética es común entre especies del mismo género; sin embargo, se ha evidenciado en organismos evolutivamente distantes como Gram positivas y Gram negativas.¹⁹¹

Los dos procesos implicados en la adquisición de resistencia son las mutaciones y la transferencia de genes de resistencia.¹⁹² Estos dos mecanismos pueden interactuar de forma sinérgica, debido a que por transferencia horizontal se pueden introducir nuevos genes de resistencia en una población y mediante mutación, estos pueden ser modificados y puede dar origen a formas más resistentes, como por ejemplo los los genes que codifican betalactamasas.¹⁹³

11.1 MUTACIÓN

La evolución es el resultado de cambios en la composición de la estructura genética de un organismo; este proceso se incrementa dependiendo de la capacidad del organismo para variar genéticamente, lo que le confiere la capacidad de colonizar y sobrevivir a cambios en el ambiente.¹⁹⁴

Debido a que la mutación es un proceso necesario para la evolución adaptativa, es esencial que exista una selección que fije las mutaciones benéficas para el organismo o para la población; sin embargo, muchas de estas variaciones pueden convertirse en mutaciones deletéreas lo que ocasionaría cambios perjudiciales para el organismo, por lo que la selección natural actuaría en favor de una baja tasa de mutación para mantener la integridad del genoma.¹⁹⁵ Es probable que este fenómeno sea el responsable del cambio del ARN al ADN como molécula hereditaria, así como la aparición de los mecanismos de reparación implicados en los procesos de replicación del ADN,¹⁹⁶ por lo que cualquier variación de las condiciones ambientales (antibióticos) permitiría el aumento de la tasa de mutación en bacterias.¹⁹⁴

Los principales procesos implicados en el incremento de la tasa de mutación son el sistema de reparación de emergencia (SOS), que es inducido cuando existe un daño en el ADN, y el sistema de reparación del ADN, el cual se encarga de corregir el emparejamiento de las bases nucleotídicas en el proceso de replicación.¹⁹⁷ Se ha encontrado que la mayoría de cepas aisladas con una alta tasa de mutación, son mutantes con defectos en su capacidad de reparar errores en la replicación y en el emparejamiento de sus bases homólogas en la recombinación.¹⁹⁸ Además, se ha encontrado que algunos antibióticos (quinolonas, penicilinas y cefalosporinas) son capaces de inducir una respuesta SOS en bacterias, lo que ocasiona que la tasa de mutación a la resistencia aumente.³³

Esto se debe a que los antibióticos provocan daños en la hebra de ADN, ocasionando que se active el sistema SOS, el cual inicia la biosíntesis de polimerasas con baja fidelidad en el emparejamiento de las bases, denominadas ADN polimerasas propensas al error; estas enzimas son capaces de seguir la replicación a pesar de los daños en la cadena molde, generando una alta tasa de mutación.¹⁹⁹ Por lo tanto, bajas concentraciones de antimicrobianos en el ambiente, animales y seres humanos, actuarían como importantes fuentes para el origen, mantenimiento y dispersión de resistencia a los antibióticos.³³ Por esta razón, una nueva alternativa para la disminución de bacterias resistentes en los procesos terapéuticos, consiste en la inhibición de la proteína Rec A, la cual es la responsable de la activación y regulación del sistema SOS implicado en la tolerancia a los antibióticos.²⁰⁰

El estrés oxidativo es considerado otro importante mecanismo inductor de mutagénesis en bacterias,²⁰¹ este tipo de lesiones son producidas por especies reactivas del oxígeno con el ADN, estos subproductos son generados de procesos metabólicos celulares y también por la exposición a compuestos químicos.²⁰² Estudios han demostrado cómo los antibióticos betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos son antimicrobianos que desencadenan un aumento en la producción de radicales hidróxilo como mecanismo secundario de muerte celular; sin embargo, se ha encontrado que a concentraciones bajas pueden inducir diferentes niveles de mutagénesis a nivel celular, debido al aumento del radical hidróxilo.^{201,203}

El uso intenso y prolongado de agentes antimicrobianos en las últimas décadas ha ocasionado un impacto importante en la microbiota humana, lo que ha permitido una selección y difusión de variantes bacterianas resistentes.²⁰⁴ La continua exposición de las bacterias ha seleccionado y fijado diferentes determinantes genéticos en las poblaciones, así como microorganismos con una alta tasa de

mutación que aumente la probabilidad que de surga una nueva variante resistente.²⁰⁴

11.2 TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE ADN

La transferencia horizontal es un fenómeno de intercambio de material genético entre organismos estrechamente relacionados o no y presenta un importante mecanismo de adquisición de novedades evolutivas.²⁰⁵ La cantidad de material genético que puede ser transferido puede ser desde fragmentos de genes, genes, operones que codifican proteínas relacionadas en complejas rutas metabólicas y hasta cromosomas enteros, lo que refleja la dinámica natural de los microorganismos.²⁰⁶ Las bacterias presentan tres métodos de transferencia del ADN: la transformación, la transducción y la conjugación.²⁰⁷

Los elementos genéticos móviles se agrupan en dos clases: aquellos elementos que se pueden mover de una célula a otra y los elementos que se movilizan en el mismo o diferentes sitios dentro de la molécula de ADN.²⁰⁷ Los plásmidos son elementos extracromosómicos capaces de replicarse autónomamente y portadores de una amplia variedad de genes, que no son esenciales para el crecimiento celular, pero que otorga al microorganismo una ventaja a situaciones ambientales adversas.²⁰⁸

Los plásmidos presentan doble cadena de ADN, superenrollado sin ninguna proteína asociada; el número de copias por célula puede variar desde una hasta cientos dependiendo del tipo plásmido.²⁰⁹ El tamaño de los plásmidos puede variar desde los que tienen 2 o 3 genes hasta los que tienen capacidad de 400 genes o más.²⁰⁷ Se han identificado diferentes tipos de plásmidos que incluyen: los plásmidos integrativos, capaces de insertarse en el genoma quedando de esta manera bajo el control del cromosoma bacteriano,²⁰⁹ los plásmidos conjugativos, los cuales son capaces de sintetizar *pilis* en la superficie bacteriana con el

propósito de permitir la transferencia de los plásmidos entre diferentes células y por último, se encuentran los plásmidos R, los cuales presentan los diferentes genes de resistencia a los antibióticos; este tipo de plásmido es el responsable de la multiresistencia contra múltiples antimicrobianos.²⁰⁹

Epidemiológicamente, los plásmidos portadores de resistencia, con capacidad conjugativa, son los principales elementos génicos que promueven la difusión de una gran variedad de genes de resistencia, por lo que contribuyen al aumento alarmante de cepas multiresistentes.²⁰⁸ Un ejemplo importante lo constituye el plásmido AmpC betalactamasas el cual presenta diferentes tipos de enzimas betalactamasas CMY, MOX, MIR y FOX de espectro extendido. Estos genes están presentes en el cromosoma de especies del género *Citrobacter*; sin embargo, actualmente se encuentran circulando en *E. coli* y *K. pneumoniae*.²¹⁰

El plásmido incl/M, es un elemento genómico muy importante en la adquisición de multiresistencia para la gran familia de bacterias gram negativa (Enterobacterias).¹⁶⁹ Estos replicones presentan 28 genes que codifican 12 diferentes tipos de betalactamasas.¹⁶⁹ Estos plásmidos constituyen un rico reservorio de resistencia a los antibióticos los cuales pueden ser difundidos entre las diversas bacterias tanto patógenas como ambientales.¹⁶⁹

Los transposones fueron considerados como ADN basura, sin ningún efecto conocido en los genes.²¹¹ Sin embargo, han sido reconocidos por ser elementos transponibles entre cromosomas, plásmidos o entre un cromosoma y un plásmido, debido a la presencia de un sistema de recombinación propio; ²⁰⁹ estos “saltos” entre los genomas influyen en la tasa de recombinación, en el reordenamiento cromosómico, en la regulación de genes y su capacidad para transformarse en nuevos genes.²¹¹ Estos elementos son persistentes en los genomas debido a que se ubican en regiones no codificantes, lo que les permite permanecer inalterados por largos períodos.²¹¹

Los transposones son elementos sin capacidad de replicación, pero presentan un gen que codifica una transposasa que les permite la transferencia a los diferentes elementos genómicos de la célula.¹⁹² Algunos transposones pueden ser integrados en plásmidos conjugativos logrando su difusión entre diferentes individuos.¹⁹² Por otro lado, los transposones conjugativos tienen la capacidad de movilizarse entre cromosomas de diferentes bacterias.¹⁹²

Los transposones pueden ser moléculas cortas de unos cientos de nucleótidos y presentar sólo los genes necesarios para la recombinación o pueden ser moléculas compuestas por genes de resistencia a los antibióticos y secuencias homólogas en sus extremos que permiten su inserción en otras regiones del genoma.²⁰⁹ Estos elementos genómicos presentan una alta tasa de mutación y están relacionados con la resistencia en especies de bacterias del género *Bacteroides* y bacterias Gram positivas.²¹² En bacterias Gram negativas y en especial en *E. coli* se han identificado diferentes categorías de transposones y cada uno le otorga resistencia a diferentes antibióticos: Tn3 a la ampicilina (betalactámico), Tn5 a la kanamicina (aminoglucósido), Tn7 a la estreptomicina (aminoglucósido) y Tn10 a la tetraciclina.²¹³

La función de los plásmidos y transposones en la adquisición y movilización de la resistencia a los antibióticos por bacterias ha sido conocida; en las últimas décadas se han identificado otros elementos importantes en este fenómeno, como los casetes genéticos de resistencia e integrones de resistencia en los plásmidos R.²¹⁴ Los integrones son elementos móviles que contienen un gen *intI* codificante de una integrasa, un sitio de recombinación (*attI*) y un sitio de captura de genes que se encuentra en el citoplasma.²¹⁵ Por lo tanto, los integrones son reservorios importantes para la aparición de nuevos genes incluyendo los de resistencia.²¹⁶

Los integrones en principio se agruparon con base en la secuencia nucleotídica del gen integrasa.²¹⁶ Sin embargo, este sistema de clasificación no a sido óptimo debido a la caracterización de una gran diversidad de integrasas en diferentes microorganismos; por tal razón, se ha clasificado así a estos elementos móviles: integrones I o de resistencia a los antibióticos, e integrones II los cuales estan asociados en el cromosoma bacteriano y no presentan genes de resistencia.²¹⁶ Estos elementos génicos no presentan un sistema de transposición, por lo que estan asociados a transposones y plásmidos que les sirven para movilizarse dentro su huésped, así como entre diferentes individuos.²¹⁴

Los casetes de genes son estructuras que presentan una secuencia codificante y flanqueda por una secuencia palindrómica conocida como 59-be o attC, que le permite recombinar en un sitio específico de la secuencia genómica.²¹⁷ Estos elementos genómicos varían en su tamaño y dependerá del tipo de proteína para la cual codifique.²¹⁵ Se han determinado decenas de estos elementos de gran importancia clínica, debido a que son los responsable de resistencia para casi todos los antibióticos conocidos.²¹⁵

12.MECANISMOS GENERALES DE RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia intrínseca como la adquirida por bacterias puede ser contemplada desde la perspectiva molecular y bioquímica, por lo que se ha clasificado en cinco grandes grupos, por las cuales las diferentes especies de bacterias han obtenido resistencia,²¹⁸ (Gráfica 9).

12.1 MODIFICACIÓN DIRECTA DEL ANTIBIÓTICO

Este mecanismo de resistencia se caracteriza molecularmente por la producción de enzimas capaces de inhibir la función de los antibióticos por hidrólisis (betalactamasas) o por modificaciones en la estructura molecular del antimicrobiano mediante reacciones de acetilación, adenilación, hidroxilación y fosforilación (antibióticos aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol).²¹⁹ La principal fuente de genes codificantes de estas proteínas se localizan en plásmidos y transposones; otros son de origen cromosómico y proporcionan una resistencia intrínseca.²¹⁹

12.2 DISMINUCIÓN DE LA PERMEABILIDAD

Este mecanismo es producto de mutaciones en los genes codificantes de elementos de la membrana o la pared celular como las porinas y lipopolisacáridos, los cuales pueden verse modificados o ausentes, por lo que afectan el transporte activo a través de las barreras celulares.²²⁰ Esta disminución en la permeabilidad dificulta la penetración de antibióticos a los receptores diana dentro de la célula.²²⁰

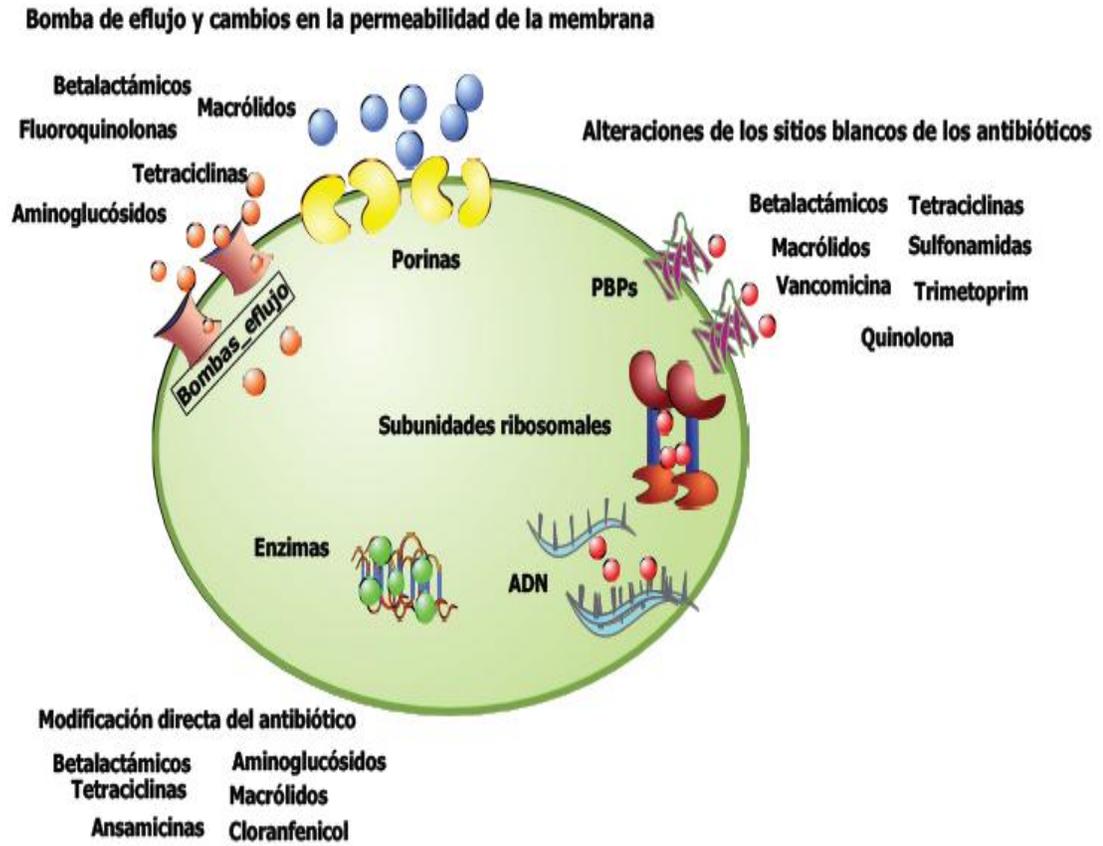
12.3 BOMBAS DE EFLUJO

Las bombas de eflujo son proteínas ubicadas en la membrana celular, cumpliendo la función de expulsar al medio exterior los antibióticos que pudieron alcanzar el interior de la bacteria.¹⁹² Este mecanismo de resistencia puede disminuir o anular la sensibilidad a muchos antibióticos como betalactámicos, quinolonas tetraciclina e incluso diferentes tipos de antisépticos y desinfectantes.²¹⁸ Los genes codificantes para estos complejos protéicos están ubicados principalmente en el cromosoma bacteriano; sin embargo, estos determinantes génicos se han localizado en plásmidos lo que ha permitido su transferencia y diseminación entre las bacterias.¹⁸⁸

12.4 ALTERACIÓN EN LOS SITIOS BLANCOS DEL ANTIBIÓTICO

Muchos de los antibióticos actúan específicamente uniéndose a receptores celulares con alta afinidad, por lo que modificaciones por parte de las bacterias en estos sitios diana han generado resistencia a los antibióticos.¹⁸⁸ Algunos ejemplos importantes son la alteración de las ADN girasas (resistencia a las quinolonas), alteración subunidades ribosomales (resistencia a macrólidos) y modificaciones en las proteínas de unión a penicilinas (PBPs) de la pared celular (resistencia a betalactámicos).²¹⁸

Figura 9. Mecanismos de resistencia bacterianos a los diferentes antibióticos.¹⁸⁸
218-220



13. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS

13.1 ALTERACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A PENICILINAS (PBPS)

El peptidoglucano cumple una función importante en la pared celular en las bacterias, pues además de resistir la presión intracelular, también le proporciona una forma definida, la cual es transmitida de generación en generación.²²¹ La biosíntesis del peptidoglucano es un proceso complejo que consta de tres etapas: una citoplasmática, una de transporte y una de polimerización.¹⁰¹ En esta última etapa de síntesis, están los objetivos clásicos de los antibióticos betalactámicos, los cuales son proteínas asociadas a la membrana celular que catalizan los últimos pasos de la síntesis del peptidoglucano, denominadas proteínas de unión a las penicilina (PBPs).²²² El número de PBPs y su sensibilidad frente a los antibióticos varían entre las especies bacterianas.²²³ Estas proteínas presentan una diferencia en su peso molecular por lo que se han dividido en dos categorías.²²³ PBPs de alta masa molecular (60 kDa) con actividad transglicosilasa y transpeptidasa (bifuncional); esta familia de proteínas está implicada en la polimerización y entrecruzamiento de las cadenas de glicano.¹⁰¹ Los PBPs de baja masa molecular presentan una actividad D-carboxipeptidasa (monofuncional) que regula el grado de reticulación o entrecruzamiento del peptidoglucano.¹⁰¹

Las proteínas de alta masa molecular presentan un dominio citoplasmático y dos dominios catalíticos en la superficie externa de la membrana, lugar donde se realiza la polimerización del peptidoglucano.²²¹ Dependiendo de la actividad catalítica de los dominios N-terminales estas PBPs se pueden clasificar en clase A y B.²²¹ Sin embargo, presentan un dominio C-terminal con actividad transpeptidasa implicado en la reticulación de las cadenas de glicano.²²¹ La clase A presentan un dominio N-terminal con actividad catalítica transglicosidasa

implicada en la elongación de las cadenas de glicano no entrecruzadas.²²⁴ La clase B presenta un dominio que se cree juega un rol importanten en la forma celular, asi como su interacción con proteínas del ciclo celular.²²⁴

Los antibióticos betalactámicos actúan como inhibidores del proceso de transpeptidación del peptidoglucano, debido a la similitud que presenta a nivel estructural el enlace del anillo betalactámico con la región terminal del pentapéptido (D-Ala-D-Ala), por lo cual compiten por el sitio de unión a las PBPs de la membrana.²²⁴ Esta alteración del proceso de síntesis ocasiona que se acumulen precursores provenientes del citoplasma, lo que induce la producción de hidrolasas y enzimas autolíticas que degradan el peptidoglucano existente.^{74,221} Sin embargo, se ha encontrado que muchas especies de bacterias son resistentes o presentan baja sensibilidad a estos fármacos debido a ciertas modificaciones en estas proteínas de membrana que pueden ser: reducción del número de PBPs, disminución de la afinidad de las PBPs o por formación de nuevas PBPs de muy baja afinidad;²²⁵ por otro lado, la adquisición de resistencia involucra un costo biológico o cambios extras para poder compensar las modificaciones en las PBPs (ejem: activación de otros genes).²²⁶

Las PBPs clase B son un receptor diana importante para la adquisición de resistencia a los betalactámicos para muchas bacterias.²²¹ Por ejemplo, se determinó que especies como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium*, bacterias gram positivas, presentan resistencia a estos antibióticos debido a la presencia de PBPs endógenas inducidas (PBP 2a y PBP5 respectivamente) que pueden realizar la polimerización del peptidoglucano en presencia del antibiótico.^{221,224}

Algunas especies como *Bacteroides fragili*, un microorganismo anaerobio estricto de la microbiota en humanos presenta una fuerte resistencia a muchos antibióticos betalactámicos, incluyendo monobactámicos. Estas bacterias presentan PBPs de

baja afinidad a los antibióticos betalactámicos como la PBP2bf. Estudios preliminares en el análisis de las secuencias nucleotídicas de los seis genes codificantes de PBPs para *Escherichia coli* y *Bacteroides fragili*, presentaron un alto grado de homología entre las secuencias génicas para las dos especies.²²⁷ Varios estudios han permitido demostrar que muchos microorganismos recurren no sólo a un mecanismo de resistencia, como por ejemplo *Helicobacter pylori*, un importante patógeno causante de enfermedades gástricas en humanos.²²⁸ Este microorganismo presenta una elevada resistencia a diferentes antibióticos como ciprofloxacina, cloranfenicol, metronidazol, rifampicina, las tetraciclinas y a los betalactámicos, como producto de la combinación de mecanismo como la alteración de PBP1A y la disminución de permeabilidad de la membrana celular.²²⁸

13.2 DISMINUCIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA

La membrana externa celular es una bicapa lipídica que muestra poca permeabilidad por los solutos hidrofílicos.²²⁰ Por lo tanto, existen proteínas que facilitan el transporte de nutrientes.²²⁰ La palabra porina fue propuesta para aquellas proteínas de membrana que forman canales de difusión no selectivos.²²⁰ Posteriormente, se determinó la presencia de estas proteínas en mitocondrias y cloroplastos.²²⁰ Las porinas son proteínas que no presentan una región hidrófoba como en la mayoría de las proteínas transmembrana y están conformadas por cadenas antiparalelas con aminoácidos hidrófobos en el exterior de la membrana y aminoácidos hidrofílicos en el interior celular. Así mismo se diferencian de las demás proteínas de membrana por estar compuestas por láminas beta y no por hélices alfa, las cuales están ubicadas de forma antiparalelas formando un cilindro, llamado barril beta.²⁸

La disminución de la permeabilidad de la membrana representa un importante mecanismo de resistencia para las bacterias, debido a que los objetivos diana de

los antibióticos están asociados a procesos intracelulares.²²⁹ Algunos fármacos como los betalactámicos emplean las porinas como mecanismo de entrada al interior celular; por otro lado, los antimicrobianos hidrofóbicos (macrólidos) se difunden a través de la membrana lipídica.²²⁹ Las células bacterianas han adquirido resistencia a los antibióticos debido a mutaciones que alteran la función y afectan la expresión de las porinas; estos pueden ser por pérdida del número de porinas de la membrana celular, por disminución de la expresión de genes que codifican un determinado tipo de porina²⁸ o por cambios en el funcionamiento de la porina, debido a alteraciones en las propiedades electrofisiológicas, contracción del tamaño del poro o aumento de la hidrofobicidad del canal proteico, restringiendo el paso de moléculas hidrófobas como penicilinas y tetraciclinas.²³⁰

La alteración de estas proteínas de transporte influye en la resistencia de antibióticos como betalactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol.²⁸ Hasta la fecha existe un gran número de estudios que evidencia la importancia de este mecanismo en la adquisición de resistencia a los antibióticos betalactámicos, por lo que se presentaran algunos ejemplos.

Serratia marcescens es una bacteria Gram negativa, importante para el área clínica, debido a que es causante de infecciones tracto urinarias, en heridas cutáneas y neumonía.²³¹ Esta especie presenta una alta resistencia a los diferentes betalactámicos, debido a su capacidad de sobreproducción de betalactamasas AmpC, codificada por un gen cromosómico (gen AmpC). Así mismo, presenta genes blaCTX-M ubicados en un plásmido conjugativo que codifica betalactamasas de espectro extendido.²³¹ Sin embargo, se ha determinado que la elevada resistencia de este patógeno a los antibióticos betalactámicos se debe a la pérdida de la porina OmpF, la cual no es expresada genómicamente, debido al insercio de elementos móviles en el marco de lectura del gen; por lo que la combinación de betalactamasas y la disminución de la

permeabilidad de la membrana son las principales causas de su resistencia a los antibióticos betalactámicos para esta especie.²³²

Klebsiella pneumoniae es uno de los principales microorganismos causantes de infecciones adquiridas en hospitales y presenta una alta resistencia a las cefalosporinas (antibiótico betalactámico), debido a la transferencia horizontal de genes codificantes de betalactamasas.²³³ Resultados obtenidos a partir del análisis de secuencias nucleotídicas de las porinas ompK36 y ompK35 encontraron alteraciones como inserciones y deleciones en la región codificante del gen ompK36 para las cepas CDM1 y HUSR2/94 respectivamente,²³³ indicando que la pérdida de porinas por alteraciones en las regiones codificantes del gen es un fenómeno importante de adaptación a cambios ambientales para las bacterias.²³³

Sin embargo, no siempre la reducción del nivel de expresión de las porinas conduce a la adquisición de resistencia, debido a que algunas mutaciones en la secuencia de genes codificantes pueden afectar la función normal de las porinas.²⁸ Estudios han demostrado que cambios en la secuencia aminoacídica influyen en alteraciones de las propiedades químicas y físicas de las porinas.^{230,234} Esto ha sido determinado en *Neisseria gonorrhoeae*, un patógeno multirresistente a los antibióticos betalactámicos y tetraciclinas.²³⁰ Modificaciones en las posiciones 120 y 121 por el aminoácido ácido aspártico es suficiente para conferir resistencia a los antibióticos. Además, se encontró que el 47% de las cepas evaluadas para la porina IB, presentaron aminoácidos como lisina y ácido aspártico en estas dos posiciones; por lo tanto, una sola mutación de un aminoácido por ácido aspártico en cualquiera de estas posiciones (120-121) es suficiente para la adquisición de resistencia a los antibióticos betalactámicos y tetraciclinas.²³⁰ Estas alteraciones aminoacídicas causan alteraciones en las propiedades electrofisiológicas y en el tamaño del poro del canal proteico en *Neisseria gonorrhoeae*.²³⁰

13.3 BOMBAS DE EFLUJO

Las bombas de eflujo son proteínas intermembranas implicadas en la eliminación de sustratos tóxicos dentro de las células,²³⁵ lo que refleja la importancia de estos sistemas proteicos en la sobrevivencia de los organismos.²³⁶ Por tal motivo, el papel que tienen estas bombas de eflujo contra la resistencia de antibióticos es algo funcionalmente natural y beneficioso para los organismos.²³⁶ Estos sistemas protéicos están presentes en bacterias Gram negativas y Gram positivas, así como en eucariotas.²³⁵ Se ha calculado que el 5-10% de los genes del genoma bacteriano están implicados en el transporte celular, en el que se incluye un gran número de genes que codifican para las bombas de eflujo.²³⁵ En bacterias, los genes codificantes para este tipo de proteínas de eflujo, se encuentran en los cromosomas que le confieren resistencia intrínseca a las bacterias, por lo que posibles mutaciones pueden ocasionar una selección de los genes implicados en la expresión de estas proteínas, sin la necesidad de su adquisición por transferencia horizontal.²³⁵ Sin embargo, muchos genes se encuentran en elementos móviles como plásmidos o transposones localizados dentro de los mismos plásmidos.²³⁷

El sistema de transporte implicado en la resistencia intrínseca y adquirida por las bacterias recibe del nombre de sistemas de multirresistencia (RMD), este complejo proteico es capaz de expulsar de una forma no selectiva, un gran número de antibióticos que no presentan similitud estructural.²³⁸

Las bombas de eflujo multirresistentes se han clasificado en cinco grandes familias: familia de unión a casete de ATP (familia ABC), familia de facilitador mayor (familia MFS), familia de expulsión de fármacos y tóxicos (MATE), familia de resistencia pequeña a fármacos (familia SMR) y familia de resistencia a división por nodulación (familia RND).²³⁹ Estas familias se diferencian en la fuente de energía empleada para la eliminación de los diversos sustratos.²⁴⁰ La familia

ABC son proteínas que dependen de la hidrólisis del ATP, la familia MATE emplea una diferencia del gradiente electroquímico por Na⁺ o H⁺. Por su parte las familias MFS, RND y SMR utilizan la fuerza protón motriz.²⁴¹ El principal grupo de bombas implicadas en la resistencia de patógenos de importancia clínica son las familias de fuerza protón motriz.²⁴¹ Las dos primeras familias (ABC y MFS) están presentes en organismos procariotas y eucariotas. Las familias restantes han sido determinadas sólo para procariotas.²⁴²

Estudios recientes han permitido identificar la sobreexpresión de diferentes genes que contribuyen a la resistencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas a los diferentes antibióticos como betalactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos.¹⁸⁸ La regulación de la expresión de los sistemas de bomba de eflujo en mutantes se debe a cuatro mecanismos principales:²⁴³ mutaciones en genes reguladores, mutaciones en genes represores o silenciadores, mutaciones en regiones promotoras de genes de proteínas transportadoras e inserciones de secuencias cerca a los genes que codifican el sistema de bombas de eflujo o dentro de los genes con función represora.²⁴³ Estos sistemas de resistencia se encuentran en general acoplados a otros mecanismos con el propósito de adquirir bajo nivel de susceptibilidad y un mayor espectro de acción contra los diferentes grupos de antibióticos.²³⁷

Algunos ejemplos importantes del trabajo conjunto de mecanismos de resistencia se aprecian en el patógeno *Escherichia coli*, donde bombas AcrAB proveen resistencia a diferentes agentes hidrofóbicos (penicilinas) que atraviesan las porinas; sin embargo, la expresión de betalactamasas de clase C, le confiere resistencia a diferentes fármacos de cefalosporinas de primera y segunda generación.²⁴² *Pseudomonas aeruginosa* ha sido un microorganismo importante de estudio, en el cual se ha podido determinar el sistema Mex, el cual está conformado por 12 diferentes proteínas de transporte de la familia RND.²⁴⁴ Algunos patógenos mutantes pueden sobreexpresar importantes complejos

multirresistentes como los sistemas MexAB-OpRM y MexAB-OpRJ involucrados en la resistencia a diferentes antibióticos como fluoroquinolonas, betalactámicos, tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprima y sulfonamidas.²⁴⁵ Sin embargo, estos patógenos son sensibles a betalactámicos como carbenicilina, aztreonam y a los aminoglucósidos.²⁴⁵ Por tal motivo, estos sistemas de transporte pueden ser considerado como un importante blanco para el desarrollo de nuevos antimicrobianos; lamentablemente existe poca información acerca de los mecanismos de sobreexpresión de estas bombas de eflujo en bacterias.²⁴²

13.4 MODIFICACIÓN DIRECTA DEL ANTIBIÓTICO (BETALACTAMASAS)

La resistencia a los antibióticos betalactámicos es considerado un problema a nivel mundial.²⁴⁶ El principal mecanismo de resistencia contra estos antimicrobianos son las betalactamasas; las cuales son enzimas capaces de hidrolizar el anillo betalactámico encargado de la actividad antimicrobiana de la molécula.²⁴⁶ La mayoría de los genes codificantes de betalactamasas se localizan en elementos móviles como plásmidos y transposones, aunque existen genes cromosómicos que le confieren al portador una resistencia intrínseca.²¹⁹ Se han reportado más de 400 betalactamasas, todas conservando su acción antimicrobiana, pero presentando una diferencia en el tipo de sustrato.¹⁶²

Esta amplia gama de betalactamasas en bacterias, es debida a mutaciones puntuales en la secuencia nucleotídica de los genes codificantes.²⁴⁷ Estas enzimas se clasifican dependiendo de la composición aminoacídica de su centro activo catalítico.⁹⁶ Las clases A,C,D se caracterizan por la presencia de un residuo de serina, por el contrario la clase B requiere de zinc como activador catalítico de la enzima, por lo que son conocidas como metalobetalactamasas.⁹⁶ Actualmente, varios estudios han demostrado la importancia de este mecanismo para bacterias de gran importancia clínica como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterococcus*

spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*,
Mycobacterium tuberculosis, entre otras.^{18, 29, 163, 248 - 251}

14. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN MUESTRAS AMBIENTALES

El análisis de antibióticos en el medio ambiente es una tarea difícil, debido a la complejidad de la matriz de análisis y a las concentraciones bajas (ng/L) de estos compuestos en los sistemas acuáticos.²⁵² Los antibióticos son compuestos que se diferencian químicamente entre las diferentes clases, por este motivo es necesario el uso de métodos analíticos propios para cada tipo de compuesto en particular.²⁵³ Diferentes clases de antibióticos han sido determinados en el medio ambiente.²⁵² Actualmente se prefieren los métodos analíticos que permitan realizar la determinación de múltiples residuos de antibióticos a la vez.²⁵² Uno de los métodos más utilizados en la determinación de los antibióticos es la cromatografía líquida, debido a su alta sensibilidad y la separación de análogos de una misma clase de antibiótico, por lo que cada tipo de muestra interactúa de manera específica con la fase móvil y estacionaria en el sistema cromatográfico.^{254,252}

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica importante en la identificación, purificación y cuantificación de una extensa variedad de moléculas de diferentes peso molecular, termolábiles y compuestos iónicos.²⁵⁵ Esta técnica presenta ciertas ventajas como: detección de analitos a bajas concentraciones, su automatización, la inyección directa de muestras, diversidad de muestras empleadas en las fases móviles y su rapidez en los análisis.²⁵⁶ Esta técnica es empleada para numerosos compuestos orgánicos y poco volátiles.²⁵⁵

Esta técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), puede presentar sistemas de detección acopladas como la espectrofotometría de UV, fluorescencia y espectrometría de masas.²⁵⁶ La absorción UV muestra gran sensibilidad para la mayoría de antibióticos y demás fármacos, sin embargo, no suministra información estructural sobre los antimicrobianos de una misma clase, ocasionado por la similitud de los espectros de absorción UV (antibióticos betalactámicos).¹⁷ El

empleo de fluorescencia como sistema de acople en la técnica HPLC, no ha sido muy utilizada debido a que la mayoría de los antibióticos no presentan fluorescencia propia. Sin embargo, esta técnica se ha podido aplicar a fármacos como las amoxilinas y amplicilinas, con una reacción de derivatización previa.²⁵⁷ La espectrometría de masas es sin duda el principal sistema de detección, ofreciendo un mejor análisis de compuestos polares no volátiles, en sensibilidad y especificidad.^{17, 257} Algunos estudios han permitido la determinación de una gran variedad de compuestos antimicrobianos en muestras de biológicas (animales de consumo), sedimentos y agua a nivel mundial.^{15, 252, 258 - 260}

La electroforesis capilar (EC) es otra técnica que permite la separación y el análisis de diversos compuestos, su principal mecanismo de detección es la espectrometría de masas.²⁶¹ Comparado con otras técnicas de uso extendido como la cromatografía líquida de alta resolución, la EC ofrece ciertas ventajas como una eficiente separación de compuestos, análisis rápidos con bajos costos y automatización.²⁶² Sin embargo, esta técnica está limitada en el estudio de compuestos farmacológicos, debido a su baja sensibilidad.²⁶³

Se pueden diferenciar varios tipos de electroforesis capilar, entre los más importantes están: la electroforesis capilar de zona, una de las técnicas más utilizadas debido a su sencillez y su poder de separación, se fundamenta en la separación de los compuestos según la relación carga-tamaño y su principal inconveniente es que no separa los compuestos neutros.²⁶³ La electrocromatografía capilar es una combinación entre la HPLC y la CE, con el propósito de reunir las mejores características de cada técnica por separado;²⁵⁷ su principal ventaja es que permite la separación de moléculas cargadas, así como de moléculas neutras.²⁶³

Dentro de este grupo se encuentra la cromatografía capilar electrocinética de micelas, en la que se emplea un detergente iónico para que forme micelas; estas a

su vez interaccionan con las moléculas no polares en su interior, causando su separación.²⁵⁷ Las diferentes técnicas de cromatografía y electroforesis capilar son técnicas importantes que han sido ampliamente usadas en la determinación de compuestos de interés biológico, industrial y químico. La cromatografía capilar electrocinética micelar es un método analítico que ha tomado auge en la comunidad científica debido su rapidez, sencillez y con una enorme ventaja: la necesidad de pequeñas cantidades de muestra.²⁶⁴

15. CONCLUSIONES

Los antibióticos actualmente son un contaminante emergente importante que además de afectar las comunidades bacterianas, también ocasionan importantes daños a diferentes organismos acuáticos y terrestres, incluyendo el hombre. Uno de los principales problemas a nivel mundial, es la resistencia a los antibióticos, debido a que muchas de las enfermedades que anteriormente parecían controladas, han surgido de nuevo como una gran amenaza. Diversos estudios han demostrado la gran plasticidad fenotípica y genotípica que presentan las bacterias para adaptarse y sobrevivir a situaciones de estrés en su medio ambiente, como producto de la introducción constante de agentes antimicrobianos.

Estos mecanismos de resistencia son propios de las bacterias, que durante millones de años han sido seleccionados y conservados en sus genomas; por lo tanto estos determinantes de resistencia (genes) están dispersos en los ecosistemas. Algunos estudios han determinado la importancia de los ecosistemas acuáticos como grandes reservorios y diseminadores de la resistencia bacteriana a nivel mundial, ya que las aguas residuales domiciliarias, industriales y de hospitales son las principales fuentes de antibióticos y bacterias patógenas de importancia clínica, las cuales al entrar en contacto con las bacterias ambientales fomentan el intercambio de material genómico a través de mecanismos de transferencia horizontal.

Por consiguiente, una solución a este fenómeno de resistencia no sólo se limitaría al desarrollo o descubrimiento de poderosos antimicrobianos, que muy seguramente serán obsoletos en poco tiempo por el surgimiento de mecanismos biológicos de resistencia bacteriana. Este problema es un fenómeno que involucraría grandes esfuerzos de las diferentes esferas sociales, industriales, científicas y gubernamentales a nivel mundial.

Los mejoramientos de las técnicas analíticas como la cromatografía y la electroforesis, han permitido dar un importante paso en el conocimiento no solo de los antibióticos, sino de una gran variabilidad de compuestos químicos que representan un riesgo para la salud y los ecosistemas. A pesar de estos grandes avances, aun existe escasa información para un centenar de sustancias químicas acerca de sus posibles efectos biológicos para la biota, por lo que es necesaria la implementación de mejores técnicas que permitan una mayor confiabilidad y sensibilidad en la detección estos compuestos trazas en el agua y en muestras biológicas, con el propósito de establecer normas que permitan la regulación a nivel mundial en el uso de los antibióticos y en general de todos los contaminantes denominados como “emergentes”.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Boxall, A. In *New and emerging water pollutants arising from agriculture*; United Kingdom, 2012; pp 1–48.
- (2) Damià Barceló, L.; López de Alda, M. J. In *Panel científico técnico de seguimiento de la política del agua. Jornada de presentación de resultados*; 2008; pp 1–27.
- (3) Petrovic, M. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2003**, 22 (10), 685–696.
- (4) Oller, I.; Malato, S.; Sánchez-Pérez, J. *Sci. Total Environ.* **2011**, 409 (20), 4141–4166.
- (5) Julián, J.; Gutiérrez, L.; Bejarano, M. M.; Mora, E. *Rev. Colomb. Ciencias Quim.* **2008**, 37 (2), 224–240.
- (6) World Health Organization. In *Bulletin of the World Health Organization*; 2014; Vol. 61, pp 383–394.
- (7) Zhang, X.-X.; Zhang, T.; Fang, H. H. P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 82 (3), 397–414.
- (8) Suárez, C.; Gudiol, F. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2009**, 27 (2), 116–129.
- (9) Martínez, J. L. *Environ. Pollut.* **2009**, 157 (11), 2893–2902.
- (10) Li, X. Z.; Mehrotra, M.; Ghimire, S.; Adewoye, L. *Vet. Microbiol.* **2007**, 121 (3-4), 197–214.
- (11) Rubtsova, M. Y.; Ulyashova, M. M.; Bachmann, T. T.; Schmid, R. D.; Egorov, a M. *Biochemistry.* **2010**, 75 (13), 1628–1649.
- (12) Davies, J.; Davies, D. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, 74 (3), 417–433.
- (13) Tello, A.; Austin, B.; Telfer, T. C. *Environ. Health Perspect.* **2012**, 120 (8), 1100–1106.
- (14) Hutzinger, O., Barceló, D., Kostianoy, A. In *Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste: Removal Technologies*, Springer-V.; Barceló, D., Petrovic, M., Ed.; Barcelona, 2008; Vol. 5, p 291.
- (15) McWhinney, B. C.; Wallis, S. C.; Hillister, T.; Roberts, J. a.; Lipman, J.; Ungerer, J. P. J. *J. Chromatogr. B* **2010**, 878 (22), 2039–2043.

- (16) González, R. R.; Luis, J.; Moreno, F.; Bolaños, P. P.; Garrido, A.; Luis, J.; Vidal, M. *Rev. Esp. Salud Pública* **2007**, 461–474.
- (17) Talero-Pérez, Y. V.; Medina, O. J.; Rozo-Núñez, W. *Univ. Sci.* **2013**, 19 (1), 11–28.
- (18) Chaudhary, M.; Payasi, A. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2014**, 7 (1), S217–S223.
- (19) Tang, S. S.; Apisarnthanarak, A.; Hsu, L. Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, 78, 3–13.
- (20) Martínez, J. L.; Fajardo, A.; Garmendia, L.; Hernandez, A.; Linares, J. F.; Martínez-Solano, L.; Sánchez, M. B. *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, 33 (1), 44–65.
- (21) Yim, G.; Wang, H. H.; Davies, J. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2007**, 362 (1483), 1195–1200.
- (22) Sengupta, S.; Chattopadhyay, M. K.; Grossart, H. P. *Front. Microbiol.* **2013**, 4, 1–13.
- (23) Martínez, J. L.; Rojo, F. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, 35 (5), 768–789.
- (24) Allen, H. K.; Donato, J.; Wang, H. H.; Cloud-Hansen, K.; Davies, J.; Handelsman, J. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 8 (4), 251–259.
- (25) Wright, G. D. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57 (10), 1451–1470.
- (26) Tenover, F. C. *Am. J. Med.* **2006**, 119 (6 SUPPL. 1), S3–S9.
- (27) Baquero, M. R.; Galán, J. C.; Turrientes, M. D. C.; Cantón, R.; Coque, T. M.; Martínez, J. L.; Baquero, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49 (11), 4754–4756.
- (28) Fernández, L.; Hancock, R. E. W. *Clin. Microbiol. Rev.* **2012**, 25 (4), 661–681.
- (29) Fuda, C. C. S.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, 62 (22), 2617–2633.
- (30) Wilke, M. S.; Lovering, A. L.; Strynadka, N. C. J. *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, 8 (5), 525–533.
- (31) Rolain, J. M.; Parola, P.; Cornaglia, G. *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, 16 (12), 1699–1701.

- (32) Eltzov, E.; Pennybaker, S.; Shanit-Orland, M.; Marks, R. S.; Kushmaro, A. *Sensors Actuators, B Chem.* **2012**, *174*, 342–348.
- (33) Rodríguez-Rojas, A.; Rodríguez-Beltrán, J.; Couce, A.; Blázquez, J. *Int. J. Med. Microbiol.* **2013**, *303* (6-7), 293–297.
- (34) Baquero, F.; Martínez, J.-L.; Cantón, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19* (3), 260–265.
- (35) Beceiro, A.; Tomás, M.; Bou, G. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26* (2), 185–230.
- (36) Binnewies, T. T.; Motro, Y.; Hallin, P. F.; Lund, O.; Dunn, D.; La, T.; Hampson, D. J.; Bellgard, M.; Wassenaar, T. M.; Ussery, D. W. *Funct. Integr. Genomics* **2006**, *6* (3), 165–185.
- (37) Roberts, M. C.; Sutcliffe, J.; Courvalin, P.; Jensen, L. B.; Rood, J.; Seppala, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (12), 2823–2830.
- (38) González, L.; Cortés, J. A. *Biomédica Rev. del Inst. Nac. Salud* **2014**, *34*, 3–12.
- (39) Villalobos, A.; Barrero, L.; Rivera, S.; Ovalle, M.; Valera, D. *Biomédica Rev. del Inst. Nac. Salud* **2014**, *34* (Supl 1), 67–80.
- (40) Zhang, T.; Li, B. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2011**, *41* (11), 951–998.
- (41) Luo, Y.; Guo, W.; Ngo, H. H.; Nghiem, L. D.; Hai, F. I.; Zhang, J.; Liang, S.; Wang, X. C. *Sci. Total Environ.* **2014**, *473-474*, 619–641.
- (42) Kuster, M.; Lopez de Alda, M.; Hernando, M.D.; Petrovic, M.; Martin-Alonso, J.; Barcelo, D. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 1689–1699.
- (43) Murray, K. E.; Thomas, S. M.; Bodour, A. *Environ. Pollut.* **2010**, *158* (12), 3462–3471.
- (44) Pal, A.; Gin, K. Y. H.; Lin, A. Y. C.; Reinhard, M. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408* (24), 6062–6069.
- (45) Rodriguez-Mozaz, S.; López de Alda, M. J.; Barceló, D. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1045* (1-2), 85–92.
- (46) Dougherty, J.; Swarzenski, P. W.; Dinicola, R. S.; Reinhard, M. *J. Environ. Qual.* **2010**, *39* (4), 1173-1180.

- (47) Schwarzenbach, R. P.; Egli, T.; Hofstetter, T. B.; von Gunten, U.; Wehrli, B. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **2010**, *35* (1), 109–136.
- (48) Becerril, J. Optimización de metodologías analíticas para la determinación de contaminantes emergentes en aguas de abastecimiento y residuales. Departamento de Química analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Santiago de Compostela, 2012.
- (49) Ginebreda, A.; Muñoz, I.; López de Alda, M.; Brix, R.; López-Doval, J.; Barceló, D. *Environ. Int.* **2010**, *36* (2), 153–162.
- (50) Fent, K.; Weston, A.; Caminada, D. *Aquat. Toxicol.* **2006**, *76* (2), 122–159.
- (51) Han, G. H.; Hur, H. G.; Kim, S. D. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25* (1), 265–271.
- (52) Santos, L. H. M. L. M.; Araújo, A. N.; Fachini, A.; Pena, A.; Delerue-Matos, C.; Montenegro, M. C. B. S. M. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *175* (1-3), 45–95.
- (53) Tyler, C. R.; Jobling, S. *Bioscience* **2008**, *58* (11), 1051- 1059.
- (54) Viqueira, F. D. *An. Real Acad. Nac. Farm.* **2015**, *81* (11), 82–102.
- (55) Ankley, G. T.; Brooks, B. W.; Huggett, D. B.; Sumpter, J. P. *Env. Sci Technol* **2007**, *1*, 8211–8217.
- (56) Aminov, R. I. *Environ. Microbiol.* **2009**, *11* (12), 2970–2988.
- (57) Cu, M. *Rev. Cuba. Med. Integr.* **1998**, *14* (4), 347–361.
- (58) Cossio, M. L. T.; Giesen, L. F.; Araya, G.; Pérez-Cotapos, M. L. S.; Vergara, R. L.; Manca, M.; Tohme, R. *et al. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. McGraw-Hill Interamericana. 2012; Vol.18
- (59) Cant, R. Optimización del uso de antimicrobianos: impacto en la evolución de la resistencia bacteriana y los costos hospitalarios. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de la Plata, 2011.
- (60) Cordi, L.; Andr, L.; Reyes, M. *Acta Medica Cordoba.* **2009**, *8* (1), 13–27.
- (61) Paredes, F. y Roca, J.J. *Offarm.* **2004**, *23*(3), 116–124.
- (62) Calvo, J.; Martínez-Martínez, L. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2009**, *27* (1), 44–52.
- (63) Sierra, J. M.; Vila, J. *Infecc. e Inmunol.* **2005**, 22–32.

- (64) Chopra, I.; Roberts, M. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65* (2), 232–260.
- (65) Sapadin, A. N.; Fleischmajer, R. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2006**, *54* (2), 258–265.
- (66) Cobos-Trigueros, N.; Ateka, O.; Pitart, C.; Vila, J. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2009**, *27* (7), 412–418.
- (67) Pigrau, C. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2003**, *0513*, 1818–1819.
- (68) Alsughayer, A.; Elassar, A.-Z.; Mustafa, S.; Sagheer, F. Al. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2011**, *02* (02), 143–148.
- (69) Calle, E. y Melgarejo, I. *Cuad. del Hosp. Clin.* **2006**, *51*, 207–214.
- (70) Fleming, A. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10* (3), 226–236.
- (71) Rolinson, G. N. *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *41* (6), 589–603.
- (72) Chain, E.; Florey, H. W.; Gardner, D.; Heatley, N. G.; Jennings, M. a.; Orr-Ewing, J.; Sanders, a. G. *Lancet* **1940**, *236* (6104), 226–228.
- (73) Abraham, E. P. et al. *The Lancet* **1941**, Vol. 238,6155, 177-189
- (74) Kong, K.-F.; Schneper, L.; Mathee, K. *Apmis* **2010**, *118* (1), 1–36.
- (75) Lázaro, E.; Oteo, J. *Inf. Ter. Sist. Nac. Salud* **2006**, *30* (1), 10–19.
- (76) Hall, B. G.; Barlow, M. *Drug Resist. Updat.* **2004**, *7* (2), 111–123.
- (77) Wright, G. D. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (1), 3–10.
- (78) Morejón, G.M. *Rev. Cubana Farm.* **2011**, *45* (3), 318–320.
- (79) Obrecht, D.; Bernardini, F.; Dale, G.; Dembowsky, K. *Emerging New Therapeutics Against Key Gram-Negative Pathogens*. Annual Reports in Medicinal Chemistry, Burlington: Academic Press, 2011; Vol. 46, 245-262
- (80) Benavides-Plascencia, L.; Aldama-Ojeda, A. L.; Vázquez, H. J. *Salud Publica Mex.* **2005**, *47* (3), 219–226.
- (81) Sutherland, R.; Rolinson, G. nn. *J. Bacteriol.* **1964**, *87* (4), 887–899.
- (82) Chambers, H. F. *Clin. Microbiol. Rev.* **1988**, *1* (2), 173–186.
- (83) Segura, S y Brenes, M. *Rev. Médica la Univ. Costa Rica* **2014**, *8* (506), 49–69.
- (84) Gómez, J.; García, E.; Hernandez-Torres, A. *Rev. Esp. Quím.* **2013**, *28* (1), 1–9.

- (85) Cruz, E.; Díaz, G. *Rev. Electrónica de las Ciencias Médicas en Cienfuegos (Medisur)* **2010**, Vol.8 (1), 13–19.
- (86) Marín, M.; Gudiol, F. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2003**, 21 (1), 42–54.
- (87) Mediavilla, A.; García-Lobo, J. In *Farmacología Humana 3ª ed. Barcelona: Masson SA*; 1998; pp 1085–1105.
- (88) Osorio, M. C. G.; Mendoza-Medellin, A.; Romero, S. P.; Plata, R. B.; Quiroz, V. *Cienc. ergo sum* **2008**, 15, 1.
- (89) Restrepo, J. *Rev. Colomb. Ciencias Pec. 1997*, 10, 38–46.
- (90) Gupta, E.; Mohanty, S.; Sood, S.; Dhawan, B.; Das, B. K.; Kapil, A. *Indian J. Med. Res.* **2006**, 124, 95–98.
- (91) Papp-Wallace, K. M.; Endimiani, A.; Taracila, M.; Bonomo, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55 (11), 4943–4960.
- (92) Rossi, F. *Clin. Infect. Dis.* **2011**, 52 (9), 1138–1143.
- (93) Braykov, N. P.; Eber, M. R.; Klein, E. Y.; Morgan, D. J.; Laxminarayan, R. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2013**, 34 (3), 259–268.
- (94) Nordmann, P.; Naas, T.; Poirel, L. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, 17 (10), 1791–1798.
- (95) Rivero Arias, E.; Herrera Torres, M. L.; Larrondo Muguercia, H.; Machado Reyes, L. A.; et al. *Acta med. Hosp. Clin. Quir. Hermanos Ameijeiras* **1998**, 8 (1), 66–70.
- (96) Drawz, S. M.; Bonomo, R. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, 23 (1), 160–201.
- (97) Barcelona, L.; Marín, M.; Stamboulían, D. *Medicina (B. Aires)*. **2008**, 68 (1), 65–74.
- (98) Mohanty, S.; Singhal, R.; Sood, S.; Dhawan, B.; Das, B. K.; Kapil, A. *Indian J. Med. Res.* **2005**, 122 (5), 425–428.
- (99) Typas, A.; Banzhaf, M.; Gross, C.; Vollmer, W. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, 10 (2), 123–136.
- (100) Martínez, J. A. y Sánchez, F. *Med. Clin. Monogr.* **2007**, 9 (7), 22–27.
- (101) Scheffers, D.; Pinho, M. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2005**, 69 (4), 585–607.
- (102) Kümmerer, K. *Chemosphere* **2009**, 75 (4), 417–434.

- (103) Pan, X.; Deng, C.; Zhang, D.; Wang, J.; Mu, G.; Chen, Y. *Aquat. Toxicol.* **2008**, 89 (4), 207–213.
- (104) Cleuvers, M. *Toxicol. Lett.* **2003**, 142 (3), 185–194.
- (105) Kolpin, D.; Furlong, E.; Meyer, M.; Thurman, M. E.; Zaugg, S. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 1202–1211.
- (106) Crane, M.; Watts, C.; Boucard, T. *Sci. Total Environ.* **2006**, 367 (1), 23–41.
- (107) Greenberg, B. M.; Huang, X.-D.; Dixon, D. G. *J. Aquat. Ecosyst. Heal.* **1992**, 1 (2), 147–155.
- (108) Näslund, J.; Hedman, J. E.; Agestrand, C. *Aquat. Toxicol.* **2008**, 90 (3), 223–227.
- (109) Cabello, F. C. *Environ. Microbiol.* **2006**, 8 (7), 1137–1144.
- (110) Holten Lützhøft, H. C.; Halling-Sørensen, B.; Jørgensen, S. E. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, 36 (1), 1–6.
- (111) Halling-Sørensen, B. *Chemosphere* **2000**, 40 (7), 731–739.
- (112) Brain, R.; Hanson, M. L.; Solomon, K. R.; Brooks, B. W. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, 192, 67–115.
- (113) Li, W.; Shi, Y.; Gao, L.; Liu, J.; Cai, Y. *Chemosphere* **2012**, 89 (11), 1307–1315.
- (114) Baguer, A. J. A.; Jensen, J.; Krogh, P. H. P. H. *Chemosphere* **2000**, 40 (7), 751–757.
- (115) Bundschuh, M.; Hahn, T.; Gessner, M. O.; Schulz, R. *Environ. Toxicol. Chem.* **2009**, 28 (1), 197–203.
- (116) Kvíderová, J.; Henley, W. J. *J. Appl. Phycol.* **2005**, 17 (4), 301–307.
- (117) Brain, R.; Johnson, D. J.; Richards, S. M.; Sanderson, H.; Sibley, P. K.; Solomon, K. R. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, 23 (2), 65–115.
- (118) Maul, J. D.; Schuler, L. J.; Belden, J. B.; Whiles, M. R.; Lydy, M. J. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, 25 (6), 1598.
- (119) Kim, Y.; Choi, K.; Jung, J.; Park, S.; Kim, P. G.; Park, J. *Environ. Int.* **2007**, 33 (3), 370–375.

- (120) Quinn, B.; Gagné, F.; Blaise, C. *Sci. Total Environ.* **2008**, 389 (2-3), 306–314.
- (121) Ferrari, B.; Mons, R.; Vollat, B.; Fraysse, B.; Paxéus, N.; Lo Giudice, R.; Pollio, A.; Garric, J. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, 23 (5), 1344–1354.
- (122) Seiler, J. P. *Toxicol. Lett.* **2002**, 131 (1-2), 105–115.
- (123) Rodríguez-Salinas, E.; González-Halphen, D. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **2009**, 51 (1-2), 44–57.
- (124) Gupta, R. S.; Golding, G. B. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, 21 (5), 166–171.
- (125) McFadden, G. I.; Roos, D. S. *Trends Microbiol.* **1999**, 7 (1988), 328–333.
- (126) Raven, J.; Allen, J. F. *Genome Biol.* **2003**, 4 (3), 209–213.
- (127) Gray, M. W.; Lang, B. F.; Cedergren, R.; Golding, G. B.; Lemieux, C.; Sankoff, D.; et al. *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26 (4), 865–878.
- (128) Salinas, T.; Duchêne, A. M.; Maréchal-Drouard, L. *Trends Biochem. Sci.* **2008**, 33 (7), 320–329.
- (129) Leganés, F.; Blanco-Rivero, A.; Fernández-Piñas, F.; Redondo, M.; Fernández-Valiente, E.; Fan, Q.; et al. *Arch. Microbiol.* **2005**, 184 (4), 234–248.
- (130) Machida, M.; Takechi, K.; Sato, H.; Chung, S. J.; Kuroiwa, H.; Takio, S.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103 (17), 6753–6758.
- (131) Matsuzaki, M.; Misumi, O.; Shin-I, T.; Maruyama, S.; Takahara, M.; Miyagishima, S.-Y.; et al. *Nature* **2004**, 428 (6983), 653–657.
- (132) Berenguer, J.; Rojo, F.; de Pedro, M.; Pfanzagl, B.; Löffelhardt, W. *FEBS Lett.* **1987**, 224 (2), 401–405.
- (133) Wall, M. K.; Mitchenall, L.; Maxwell, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101 (20), 7821–7826.
- (134) Manuell,; Beligni, M. V; Yamaguchi, K.; Mayfield, S. P. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, 32 (Pt 4), 601–605.
- (135) Vaz-Moreira, I.; Nunes, O. C.; Manaia, C. M. *FEMS Microbiol. Rev.* **2014**, 38 (4), 761–778.

- (136) Rizzo, L.; Manaia, C.; Merlin, C.; Schwartz, T.; Dagot, C.; Ploy, M. C.; Michael, I.; Fatta-Kassinos, D. *Sci. Total Environ.* **2013**, *447*, 345–360.
- (137) Dantas, G.; Sommer, M. O.; Oluwasegun, R. D.; Church, G. M. *Science*. **2008**, *320* (5872), 100–103.
- (138) D'Costa, V. M.; King, C. E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W. W. L.; Schwarz, C.; et al. *Nature* **2011**, *477* (7365), 457–461.
- (139) Segawa, T.; Takeuchi, N.; Rivera, A.; Yamada, A.; Yoshimura, Y.; Barcaza, G.; et al. *Environ. Microbiol. Rep.* **2013**, *5* (1), 127–134.
- (140) Batt, A. L.; Snow, D. D.; Aga, D. S. *Chemosphere* **2006**, *64* (11), 1963–1971.
- (141) Wellington, E. M.; Boxall, A. B.; Cross, P.; Feil, E. J.; Gaze, W. H.; Hawkey, P. M.; et al. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13* (2), 155–165.
- (142) Martinez, J. L. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2009**, *276* (1667), 2521–2530.
- (143) D'Costa, V. M.; McGrann, K. M.; Hughes, D. W.; Wright, G. D. *Science* **2006**, *311* (5759), 374–377.
- (144) Martínez Menéndez, J. L. *Rev. Sapuvet Salud Pública* **2010**, *1* (2), 95–105.
- (145) Yang, S.; Carlson, K. *Water Res.* **2003**, *37* (19), 4645–4656.
- (146) Falcone-Dias, M. F.; Vaz-Moreira, I.; Manaia, C. M. *Water Res.* **2012**, *46*, 3612–3622.
- (147) Messi, P.; Guerrieri, E.; Bondi, M. *Sci. Total Environ.* **2005**, *346* (1-3), 213–219.
- (148) Ushida, K.; Segawa, T.; Kohshima, S.; Takeuchi, N.; Fukui, K.; Li, Z.; Kanda, H. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2010**, *56* (1), 43–52.
- (149) Aminov, R. I.; Mackie, R. I. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *271* (2), 147–161.
- (150) Ding, C.; He, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87* (3), 925–941.
- (151) Giraud, E.; Cloeckert, A.; Baucheron, S.; Mouline, C.; Chaslus-Dancla, E. *J. Med. Microbiol.* **2003**, *52* (8), 697–703.
- (152) Cleaveland, S. *Microbiol. Today* **2003**, *30* (4), 155–156.
- (153) Harris, R. N.; James, T. Y.; Lauer, A.; Simon, M. A.; Patel, A. *Ecohealth* **2006**, *3* (1), 53–56.

- (154) Schramm, A.; Davidson, S. K.; Dodsworth, J.; Drake, H. L.; Stahl, D.; Dubilier, N. *Environ. Microbiol.* **2003**, 5 (9), 804–809.
- (155) Levy, J. *Am. J. Gastroenterol.* **2000**, 95 (1), S8–S10.
- (156) Taylor, N. G. H.; Verner-Jeffreys, D. W.; Baker-Austin, C. *Trends Ecol. Evol.* **2011**, 26 (6), 278–284.
- (157) Smet, A.; Martel, A.; Persoons, D.; Dewulf, J.; Heyndrickx, M.; Herman, L.; et al. *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, 34 (3), 295–316.
- (158) Pallecchi, L.; Bartoloni, A.; Paradisi, F.; Rossolini, G. M. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2008**, 6 (5), 725–732.
- (159) Thaller, M. C.; Migliore, L.; Marquez, C.; Tapia, W.; Cedeño, V.; Rossolini, G. M.; Gentile, G. *PLoS One* **2010**, 5 (2), e8989.
- (160) Costa, D.; Poeta, P.; Sáenz, Y.; Vinué, L.; Coelho, A. C.; Matos, M.; et al. *Microb. Drug Resist.* **2008**, 14 (1), 71–77.
- (161) García-Hernández, A. M.; García-Vázquez, E.; Hernández-Torres, A.; Ruiz, J.; Yagüe, G.; Herrero, J. A.; Gómez, J. *Rev. Esp. Quimioter.* **2011**, 24 (2), 57–66.
- (162) Guenther, S.; Ewers, C.; Wieler, L. H. *Front. Microbiol.* **2011**, 2, 246.
- (163) Paterson, D. L.; Bonomo, R. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, 18 (4), 657–686.
- (164) Bradford, P. *Clin. Microbiol Rev* **2001**, 14 (4), 933–951.
- (165) Pitout, J. D. D.; Laupland, K. B. *Lancet. Infect. Dis.* **2008**, 8 (3), 159–166.
- (166) Walsh, T. R. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, 36, S8–S14.
- (167) Roschanski, N.; Fischer, J.; Guerra, B.; Roesler, U. *PLoS One* **2014**, 9 (7), e100956.
- (168) Schmiedel, J.; Falgenhauer, L.; Domann, E.; Bauerfeind, R.; Prenger-Berninghoff, E.; Imirzalioglu, C.; Chakraborty, T. *BMC Microbiol.* **2014**, 14 (1), 187.
- (169) Adamczuk, M.; Zaleski, P.; Dziewit, L.; Wolinowska, R.; Nieckarz, M.; Wawrzyniak, P.; et al. *Bio Med Res. Int.* **2015**, 2015, 1 - 12.
- (170) Mathers, A. J.; Peirano, G.; Pitout, J. D. D. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, 28 (3), 565–591.

- (171) Carattoli, A. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14* (1), 117–123.
- (172) Chang, Q.; Wang, W.; Regev-Yochay, G.; Lipsitch, M.; Hanage, W. P. *Evol. Appl.* **2015**, *8* (3), 240–247.
- (173) Singer, R. S.; Williams-Nguyen, J. *Curr. Opin. Microbiol.* **2014**, *19*, 1–8.
- (174) Van Duijkeren, E.; Greko, C.; Pringle, M.; Baptiste, K. E.; Catry, B.; Jukes, H.; et al. *Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69* (8), 2022–2031.
- (175) Wu, H.; Wang, Y.; Wu, Y.; Qiao, J.; Li, H.; Zheng, S.; et al. *Foodborne Pathog. Dis.* **2015**, *12* (3), 228–234.
- (176) Lim, J.-S.; Choi, D.-S.; Kim, Y.-J.; Chon, J.-W.; Kim, H.-S.; Park, H.-J.; et al. *Foodborne Pathog. Dis.* **2015**, *12* (9), 741–748.
- (177) Leverstein-van Hall, M.; Dierikx, C. M.; Cohen Stuart, J.; Voets, G. M.; van den Munckhof, M. P.; van Essen-Zandbergen, A.; et al. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17* (6), 873–880.
- (178) Shah, S. Q.; Cabello, F. C.; L'abée-Lund, T. M.; Tomova, A.; Godfrey, H. P.; Buschmann, A. H.; Sørum, H. *Environ. Microbiol.* **2014**, *16* (5), 1310–1320.
- (179) Abreu, R.; Castro, B.; Espigares, E.; Rodríguez-Álvarez, C.; Lecuona, M.; Moreno, E.; Espigares, M.; Arias, Á. *Foodborne Pathog. Dis.* **2014**, *11* (11), 868–873.
- (180) Overdeest, I.; Willemsen, I.; Rijnsburger, M.; Eustace, a; Xu, L.; Hawkey, P.; et al. *Emerg Infect Dis* **2011**, *17* (7), 1216–1222.
- (181) Lavilla Lerma, L.; Benomar, N.; Knapp, C. W.; Correa Galeote, D.; Gálvez, A.; Abriouel, H. *PLoS One* **2014**, *9*, e114252.
- (182) Hoban, D. J.; Badal, R.; Bouchillon, S.; Hackel, M.; Kazmierczak, K.; Lascols, C.; Hawser, S. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *79* (3), 367–372.
- (183) Hawkey, P. M. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14* (SUPPL. 1), 159–165.
- (184) Bush, K. *Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 134–143.
- (185) Biedenbach, D.; Bouchillon, S.; Hackel, M.; Hoban, D.; Kazmierczak, K.; Hawser, S.; Badal, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (2), 826–830.
- (186) Cantón, R.; Novais, A.; Valverde, A.; Machado, E.; Peixe, L.; Baquero, F.; Coque, T. M. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14* (1), 144–153.

- (187) Henriques Normark, B.; Normark, S. *J. Intern. Med.* **2002**, 252 (2), 91–106.
- (188) Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O, Piddock, L. V. J. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, 42 (13), 42–51.
- (189) Hancock, R. E. W.; Speert, D. P. *Drug Resist. Updat.* **2000**, 3 (4), 247–255.
- (190) Levy, S. B.; Marshall, B. *Nat. Med.* **2004**, 10 (12), S122–S129.
- (191) Courvalin, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38 (7), 1447–1451.
- (192) Martínez, L. *Jano* **2006**, 20-26 (3), 172–177.
- (193) Blazquez, J.; Morosini, M. I.; Negri, M. C.; Gonzalez-Leiza, M.; Baquero, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39 (1), 145–149.
- (194) Galán, J., Baquero, M., Morosini, M y Baquero, F. *Asoc. Colomb. Infectología* **2006**, 10 (1), 22–29.
- (195) Sniegowski, P. D.; Gerrish, P. J.; Johnson, T.; Shaver, A. *Bioessays* **2000**, 22 (12), 1057–1066.
- (196) Jablonka, E.; Lamb, M. J. *J. Theor. Biol.* **2006**, 239 (2), 236–246.
- (197) Bayliss, C.; Moxon, R. *ASM news.* 2002, pp 549–555.
- (198) Couce, A.; Blázquez, J. *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, 33 (3), 531–538.
- (199) Jarosz, D. F.; Beuning, P. J.; Cohen, S. E.; Walker, G. C. *Trends Microbiol.* **2007**, 15 (2), 70–77.
- (200) Wigle, T. J.; Sexton, J. Z.; Gromova, A. V; Hadimani, M. B.; A, M.; Smith, G. R.; Yeh, L.; Singleton, S. F. *J. Biomol. Screen.* **2010**, 14 (9), 1092–1101.
- (201) Kohanski, M.; DePristo, M.; Collins, J. J. *Mol. Cell* **2010**, 37 (3), 311–320.
- (202) Vereau, A. *Rev. científica la Univ. César Vallejo* **2009**, 1 (1), 96–101.
- (203) Kohanski, M. a.; Dwyer, D. J.; Hayete, B.; Lawrence, C. a.; Collins, J. J. *Cell* **2007**, 130 (5), 797–810.
- (204) Thi, T. D.; Lopez, E.; Rodriguez-Rojas, A.; Rodriguez-Beltran, J.; Couce, A.; Guelfo, J. R.; et al. *Antimicrob. Chemother.* **2011**, 66 (3), 531–538.
- (205) Boto, L. *Proc. Biol. Sci.* **2010**, 277 (1683), 819–827.
- (206) Andam, C. P.; Fournier, G. P.; Gogarten, J. P. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, 35 (5), 756–767.
- (207) Bennett, P. M. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 153 (S1), S347–S357.

- (208) Redondo, C.; Alonso, G. *Rev. la Soc. Venez. Microbiol.* **2007**, *27*, 100–107.
- (209) Sánchez, P. *Rev. Spei Domus* **2012**, *8*, 31–37.
- (210) Livermore, D. M. *Korean J. Intern. Med.* **2012**, *27* (2), 128–142.
- (211) Biemont, C. *Genetics* **2010**, *186* (4), 1085–1093.
- (212) Whittle, G.; Shoemaker, N. B.; Salyers, A. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59* (12), 2044–2054.
- (213) Roberts, A. P.; Chandler, M.; Courvalin, P.; Guédon, G.; Mullany, P.; Pembroke, T.; et al. *Plasmid* **2008**, *60* (3), 167–173.
- (214) González R, G.; Mella M, S.; Zemelman Z, R.; Bello T, H.; Domínguez Y, M. *Rev. Med. Chil.* **2004**, *132* (5), 619–626.
- (215) Hall, R. M.; Collis, C. M. *Mol. Microbiol.* **1995**, *15* (4), 593–600.
- (216) Boucher, Y.; Labbate, M.; Koenig, J. E.; Stokes, H. W. *Trends Microbiol.* **2007**, *15* (7), 301–309.
- (217) Di Conza, J.; Gutkind, G. O. *Rev. Argent. Microbiol.* **2010**, *42* (1), 63–78.
- (218) Pérez Cano, H. J.; Contreras, A. R. *Rev. Med. (Puebla).* **2013**, *4* (4), 186–191.
- (219) Alekshun, M. N.; Levy, S. B. *Cell* **2007**, *128* (6), 1037–1050.
- (220) Nikaido, H. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67* (4), 593–656.
- (221) Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala, J.; Charlier, P. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 234–258.
- (222) Paik, J.; Kern, I.; Lurz, R.; Hakenbeck, R. *J. Bacteriol.* **1999**, *181* (12), 3852–3856.
- (223) Georgopapadakou, N. H.; Liu, F. Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1980**, *18* (1), 148–157.
- (224) Zapun, A.; Contreras-Martel, C.; Vernet, T. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 361–385.
- (225) Malouin, F.; Bryan, L. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, *30* (1), 1–5.
- (226) Andersson, D. I.; Hughes, D. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8* (4), 260–271.
- (227) Ayala, J. *J. Med. Microbiol.* **2005**, *54* (11), 1055–1064.

- (228) Kwon, D. H.; Dore, M. P.; Kim, J. J.; Kato, M.; Lee, M.; Wu, J. Y.; Graham, D. Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47* (7), 2169–2178.
- (229) Delcour, A. H. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, *1794* (5), 808–816.
- (230) Olesky, M.; Zhao, S.; Rosenberg, R. L.; Nicholas, R. *J. Bacteriol.* **2006**, *188* (7), 2300–2308.
- (231) Ivanova, D.; Markovska, R.; Hadjieva, N.; Schneider, I.; Mitov, I.; Bauernfeind, A. *J. Hosp. Infect.* **2008**, *70* (1), 60–65.
- (232) Suh, B.; Bae, I. K.; Kim, J.; Jeong, S. H.; Yong, D.; Lee, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (12), 5057–5061.
- (233) Hernández-Allés, S.; Benedí, V. J.; Martínez-Martínez, L.; Pascual, Á.; Aguilar, A.; Tomás, J. M.; Albertí, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (4), 937–939.
- (234) Olesky, M.; Hobbs, M.; Nicholas, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (9), 2811–2820.
- (235) Webber, M.; Piddock, L. J. V. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51* (1), 9–11.
- (236) Piddock, L. J. V. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4* (8), 629–636.
- (237) Van Bambeke, F.; Glupczynski, Y.; Plésiat, P.; Pechère, J. C.; Tulkens, P. M. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51* (5), 1055–1065.
- (238) Sánchez Díaz, P. *Rev. Esp. Quimioter.* **2003**, *16* (2), 172–187.
- (239) Coyne, S.; Courvalin, P.; Perichon, B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (3), 947–953.
- (240) Opazo, A. C.; Domínguez, M. Y.; Bello, H. T. y González, G. R., S. M. M. *Rev. Chil. Infect.* **2009**, *26* (6), 499–503.
- (241) Li, X.-Z.; Nikaido, H. *Drug*, 2009, *69* (12), 1555–1623
- (242) Marchetti, M.; Errecalde, J. y Mestorino, N. *Analecta Vet.* **2011**, *31* (2), 40–53.
- (243) Piddock, L. J. V. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *19* (2), 382–402.
- (244) Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, L.; Mizoguchi, S. D.; Warrenner, P.; Hickey, M. J.; et al. *Nature* **2000**, *406* (6799), 959–964.
- (245) Poole, K. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *3* (2), 255–264.

- (246) Lin, J.; Nishino, K.; Roberts, M. C.; Tolmasky, M.; Aminov, R. I.; Zhang, L. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 4–7.
- (247) Ahmad, S. S.; Ali, F. *Eur. Sci. J.* **2014**, *10* (9), 193–209.
- (248) Zowawi, H. M.; Balkhy, H. H.; Walsh, T. R.; Paterson, D. L. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26* (3), 361–380.
- (249) Rice, L. B. *Am. J. Infect. Control* **2006**, *119*, 11–19.
- (250) Drawz, S. M.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58* (4), 1835–1846.
- (251) Walsh, T. R.; Weeks, J.; Livermore, D. M.; Toleman, M. *Lancet Infect. Dis.* **2011**, *11* (5), 355–362.
- (252) Seifrtová, M.; Nováková, L.; Lino, C.; Pena, A.; Solich, P. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *649* (2), 158–179.
- (253) Acevedo, D.; Montero, P. M.; Jaimes, J. D. *Inf. tecnológica* **2015**, *26* (1), 71–76.
- (254) Izquierdo, P.; Mavárez, R.; Ysambertt, F.; Piñero, M. Y.; Torres, G. *Rev. científ. ,FCV-LUZA* , **2010**, *XX* (4), 430–435.
- (255) Trujillo, E.; Fonseca, G.; García, M.; Martínez, V. *Form. Univ.* **2009**, *2* (1), 7–16.
- (256) Kromidas, S. More Practical Problem Solving in HPLC. *Wiley-VCH Verlag GmbH* **2002**, *3*, 3–527.
- (257) Bailón Pérez, M. Uso de técnicas separativas miniaturizadas como alternativa a la determinación de antibióticos beta-lactámicos en fármacos, agua y alimentos. Departamento de Química Analítica, Universidad de Granada, 2009, 1- 439.
- (258) Moreno-Bondi, M. C.; Marazuela, M. D.; Herranz, S.; Rodriguez, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395* (4), 921–946.
- (259) Speltini, A.; Sturini, M.; Maraschi, F.; Profumo, A. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 1115–1131.
- (260) Jiang, M.; Wang, L.; Ji, R. *Chemosphere* **2010**, *80* (11), 1399–1405.

- (261) Lara, F. J.; García-Campaña, A. M.; Alés-Barrero, F.; Bosque-Sendra, J. M.; García-Ayuso, L. E. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (22), 7665–7673.
- (262) Prokhorova, F.; Shapovalova, E. N.; Shpigun, O. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *53* (5), 1170–1179.
- (263) Huertas, J. Desarrollo de nuevas metodologías para análisis ambiental, alimentario y clínico mediante fia, hplc y ce con diversos tipos de detección espectroscópica. Departamento de Química Analítica, Universidad de Granada, **2008**, 1-319.
- (264) León, C. Producción y cuantificación de un antibiótico por electroforesis capilar. Unidad Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional de México, **2008**.