



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Estudios iniciales para la caracterización del modo de acción molecular de una nueva serie química con actividad antimicrobiana

Autora

Ana Cristina Millán Placer

Director

Santiago Ramón García

Ponente

José Antonio Aínsa Claver

Grupo de Genética de Micobacterias

Departamento de Microbiología, Medicina
Preventiva y Salud Pública

Universidad de Zaragoza

ÍNDICE MEMORIA

RESUMEN/ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. ORIGEN DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	3
1.2. PROBLEMÁTICA DE LA RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS	4
1.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN BACTERIAS	7
1.3.1. RESISTENCIA INTRÍNSECA Y ADQUIRIDA.....	7
1.3.2. IMPLICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE BOMBAS DE EFLUJO	9
1.4. PROCESO DE DESCUBRIMIENTO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS (DRUG DISCOVERY) ..	11
1.4.1. Identificación y validación del hit.....	11
1.4.2. Hit to lead.....	13
1.4.3. Optimización del lead	14
1.4.4. Ensayos preclínicos y fases clínicas en humanos.....	14
2. ANTECEDENTES.....	15
3. OBJETIVOS DEL TRABAJO	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1. CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO. CONSERVACIÓN DE CEPAS	17
4.1.1. CEPAS BACTERIANAS	17
4.1.2. MEDIOS DE CULTIVO	18
4.1.3. CONDICIONES GENERALES DE CULTIVO.....	18
4.1.4. CONSERVACIÓN DE CEPAS.....	19
4.2. COMPUESTOS.....	19
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS	20
4.3.1. DETERMINACIÓN DE LA CIM POR MICRODILUCIÓN	20
4.3.2. DETERMINACIÓN DE LA CIM EN MEDIO SÓLIDO	21
4.3.3. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE MUERTE.....	22
4.4. MÉTODOS DE ENSAYO DE COMBINACIONES ANTIMICROBIANAS.....	22
4.4.1. EVALUACIÓN DE COMBINACIONES MEDIANTE CIM EN LÍQUIDO	22
4.4.2. ENSAYO DE CHECKERBOARD	23
4.5. APROXIMACIONES PARA LA SELECCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES Y CONFIRMACIÓN DEL PERFIL DE RESISTENCIA.....	24
4.5.1. PLACAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COMPUESTO.....	25
4.5.2. PLACAS CON GRADIENTE DE CONCENTRACIÓN DEL COMPUESTO	25
4.5.3. CURVAS DE CINÉTICA DE MUERTE CON ADICIÓN DE COMPUESTO A DIFERENTES TIEMPOS.....	26
4.5.4. BANCA DE MUTANTES POR TRANSPOSICIÓN	26

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS	28
5.1.1. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> MSSA.....	28
5.1.2. <i>MYCOBACTERIUM SMEGMATIS</i> MC ² 155.....	32
5.1.3. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS COMPUESTOS FRENTE A OTROS MICROORGANISMOS.....	36
5.1.4. ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS EN COMBINACIÓN CON INHIBIDORES DE BOMBAS DE EFLUJO (EPIs).....	38
5.1.5. ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS EN COMBINACIÓN CON BEDAQUILINA FRENTE A <i>M. AVIUM</i> Y <i>M. ABSCESSUS</i>	41
5.2. AISLAMIENTO DE MUTANTES RESISTENTES A LOS COMPUESTOS.....	43
5.2.1. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> MSSA.....	43
5.2.2. <i>MYCOBACTERIUM SMEGMATIS</i>	45
6. DISCUSIÓN GENERAL	47
7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	50
8. BIBLIOGRAFÍA.....	52
ANEXOS	I

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistencia a agentes antimicrobianos en bacterias.....	8
Figura 2. Línea del tiempo del desarrollo de agentes antibacterianos.....	11
Figura 3. Representación esquemática de valores de FIC _A frente a valores de FIC _B	24
Figura 4. Procedimiento para la preparación de placas con gradiente de concentración.....	26
Figura 5. Representación esquemática del transposón TnSPAZ.....	27
Figura 6. Curva de cinética de muerte en <i>S. aureus</i> , con adición de compuesto #1 (A) o #9 (B).....	30
Figura 7. Curva de cinética de muerte en <i>S. aureus</i> con adición de compuesto #1 a 0 y 24 h ...	31
Figura 8. Curva de cinética de muerte en <i>M. smegmatis</i> , con adición de #1 (A) o #9 (B).....	34
Figura 9. Curva de cinética de muerte en <i>M. smegmatis</i> , con adición de compuesto CDRD #1 (A) o CDRD #9 (B).....	35
Figura 10. Curva de cinética de muerte en <i>M. smegmatis</i> , con adición de compuesto CDRD #1 (A) o CDRD #9 (B).....	36
Figura 11. Valores de FIC de bedaquilina (BDQ) frente a los valores de FIC de CDRD #6 correspondientes, para <i>M. abscessus</i> (A) y <i>M. avium</i> (B) en función del medio (7H9 o MH II).....	42
Figura 12. Placas de selección de mutantes resistentes al compuesto #1 (A) o a RIF (B) en <i>S.</i> <i>aureus</i>	44
Figura 13. Placas de selección de mutantes resistentes con gradiente de concentración del compuesto CDRD #1 (0 a 10xCIM)	45

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.....	17
Tabla 2. Agentes antimicrobianos utilizados en este trabajo, disolvente y referencia.....	19
Tabla 3. CIM de los compuestos CDRD y RIF frente a <i>S. aureus</i> , determinada en medio líquido MH II.....	28
Tabla 4. CIM en sólido de los compuestos CDRD #1 y #9 así como de RIF en función del número de UFC totales (10^3 , 10^5 y 10^7).....	29
Tabla 5. CIM de los compuestos CDRD e INH frente a <i>M. smegmatis</i> , determinada en medio líquido MH II.....	32
Tabla 6. CIM en sólido de los compuestos CDRD #1 y #9 y de INH, en función del número de UFC totales	33
Tabla 7. CIM de los compuestos CDRD frente a las bacterias indicadas, determinada en medio líquido MH II.....	37
Tabla 8. CIM de los compuestos frente a diversas micobacterias, en medio líquido.....	37
Tabla 9. CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los compuestos CDRD #1, #2 y #8 frente a <i>S. aureus</i> en ausencia o presencia de PA β N, CCCP, REP y VER a las concentraciones indicadas ($\mu\text{g}/\text{mL}$).....	39
Tabla 10. CIM de los compuestos CDRD #1, #2 y #9 frente a <i>P. aeruginosa</i> , en ausencia o presencia de PA β N, CCCP o REP a las concentraciones indicadas	40
Tabla 11. CIM de los compuestos CDRD #1, #2 y #9 frente a <i>K. pneumoniae</i> , en ausencia o presencia de PA β N, CCCP, REP o VER a las concentraciones indicadas.....	40
Tabla 12. Ensayo de checkerboard del compuesto CDRD #6 en combinación con BDQ frente a <i>M. abscessus</i> y <i>M. avium</i> en medio 7H9 y MH II	42

ABREVIATURAS

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

AMR: Resistencia a los antimicrobianos

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo

BLS: Nivel de bioseguridad

CCCP: Carboxilciadina m-clorofenilhidrazona

CDRD: Centro de Investigación y Desarrollo de Drogas.

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

CLSI: Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio

CPM: Concentración preventiva de mutantes

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

EPI: Inhibidores de bombas de eflujo

FIC: Concentración Inhibitoria Fraccionaria

FICI: Índice FIC

FDA: Administración de Fármacos y Alimentos

FBDD: Diseño racional basado en fragmentos

GGM: Grupo de Genética de Micobacterias

HTS: Cribado de alto rendimiento

LB: Luria Bertani

MDR: Multirresistente a los fármacos

MFS: Superfamilia principal de transportadores facilitadores

MH II: Mueller Hinton II

MNT: Micobacterias no tuberculosas

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

MTA: Acuerdo de transferencia de material

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAβN: Phenilalanina-arginina-β-naftilamida

PBS: Buffer fosfato salino

REP: Reserpina

RND: Resistencia nodulación división celular

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal

SD: Desviación estándar

SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades y Microbiología Clínica

TB: Tuberculosis

UFC: Unidad formadora de colonias

VER: Verapamil

VRE: *Enterococcus spp.* resistente a vancomicina

VRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina

XDR: Extensamente resistente a los fármacos

RESUMEN

La incidencia de infecciones resistentes a los antibióticos está aumentando en todo el mundo, siendo cada vez más difíciles de tratar. Desde la década de 1980, el número de agentes antimicrobianos desarrollados y aprobados por las agencias reguladoras ha disminuido significativamente, limitando las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones resistentes. Por esta razón, es necesario identificar y caracterizar nuevas moléculas pequeñas capaces de tratar estas enfermedades infecciosas.

En un programa de cribado de compuestos realizado en la Universidad de British Columbia (UBC) en Canadá, se identificó una nueva serie química con potente actividad antimicrobiana. Posteriormente, se inició un programa de medicina química para generar nuevos compuestos más potentes y con menor toxicidad. El objetivo de este Trabajo Fin de Máster ha sido establecer las bases para identificar el mecanismo de acción molecular de esta nueva serie química. Para ello, se ha tratado de aislar mutantes resistentes a los compuestos mediante dos aproximaciones complementarias: (i) ensayos estándar de selección de mutantes resistentes realizados con la cepa silvestre en presencia de concentraciones inhibitorias de compuesto; (ii) banca de mutantes por transposición en *Mycobacterium smegmatis* HS42. Previamente, fue necesario caracterizar la actividad de los compuestos con el fin de establecer las condiciones óptimas para los ensayos de aislamiento de mutantes.

Estos compuestos presentaron actividad frente a diversas bacterias Gram-positivas y micobacterias, con valores de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en el rango de 2-16 µg/mL. Además, la combinación de estos compuestos con concentraciones subinhibitorias de phenilalanina-arginina-β-naftilamida (PAβN) -un inhibidor de bombas de eflujo (EPI)- tuvo actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, sugiriendo que esta nueva serie química en combinación con EPIs también podría emplearse para tratar infecciones causadas por bacterias Gram-negativas. Los ensayos de cinética de muerte han revelado que los compuestos son muy potentes (bactericidas) a partir de una cierta concentración crítica.

Mediante las aproximaciones empleadas en este trabajo no se han seleccionado colonias resistentes a los compuestos, por lo que se ha podido estimar que la frecuencia de mutación es baja ($<10^{-8}$), lo cual es un aspecto prometedor para su potencial uso como tratamiento antimicrobiano.

ABSTRACT

The incidence of antibiotic-resistant infections is rising worldwide and becoming increasingly difficult to treat. Since the 1980s, the number of new antibiotics developed and approved by regulatory agencies has fallen significantly, leaving fewer options to treat resistant bacteria. For this reason, there is an urgent need to identify and characterize new small molecules with the potential to become antibiotic therapies able to treat these infectious diseases.

A new chemical series with potent antimicrobial activity was identified in a high-throughput screening performed at the University of British Columbia (UBC) in Canada. Subsequently, a chemical medicine program was initiated to produce new more potent compounds with less toxicity. The aim of this Master Thesis was to initiate studies to elucidate the molecular mode of action of this new chemical family of compounds. Two complementary approaches were used to isolate mutants resistant to the compounds: first, standard mutant isolation assays at inhibitory concentrations using the wild-type strain; second, a transposon library of *Mycobacterium smegmatis* HS42 mutants. Previously, several assays were performed to characterize the activity of the compounds and to establish optimal conditions for mutant isolation assays.

Compounds were effective against Gram-positive bacteria and mycobacteria, with Minimal Inhibitory Concentration (MIC) values in the range of 2-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Moreover, the combination of these compounds with sub-inhibitory concentrations of phenylalanine arginyl β -naphthylamide (PA β N) -an efflux pump inhibitor (EPI)- was effective against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*, suggesting that EPIs might allow the use of this chemical series to also treat Gram-negative infections. Kill kinetic assays revealed that the compounds have strong bactericidal activity above a critical concentration.

Mutants resistant to the compounds were not detected by the approaches employed, so the mutation frequency was estimated to be low ($<10^{-8}$). This indicates their potential use as antimicrobial agents.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ORIGEN DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

El descubrimiento de los agentes antimicrobianos ha sido uno de los hitos de la medicina más importantes del siglo XX. Desde su introducción en la clínica, han reducido la morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas, y han permitido numerosos avances en el área quirúrgica, en la quimioterapia del cáncer y en trasplantes de órganos.

La introducción de los primeros agentes antimicrobianos [sulfonamidas (1936) y penicilinas (1938)] durante la primera mitad del siglo XX fue seguido por la identificación de un gran número de moléculas con actividad antimicrobiana (producidas por hongos y bacterias) mediante la estrategia desarrollada por Selman Waksman, conocida como plataforma de Waksman (1). La efectividad de los ensayos realizados en esta etapa, conocida como “edad de oro” de los agentes antimicrobianos, llevó al descubrimiento de las principales clases de antibióticos que se utilizan hoy en día [aminoglicósidos (1946), cloranfenicol (1948), macrólidos (1951), tetraciclinas (1952), glicopéptidos (1958) y rifamicinas (1958)] (2) (3).

A mediados de los años 60 se generaron derivados semi-sintéticos de los agentes antimicrobianos anteriores con mejores propiedades (mayor actividad y especificidad, menor susceptibilidad a la degradación por enzimas, etc.), muchos de los cuales tuvieron éxito y siguen utilizándose hoy en día. Sin embargo, en la década de 1980, no se lograron descubrir nuevas clases de antibióticos utilizando las técnicas tradicionales (a partir de los productos naturales), y aquellos compuestos identificados eran complejos y difíciles de obtener por síntesis química (4).

A comienzos de 1990, con el desarrollo de nuevas tecnologías que permitieron la secuenciación de genomas bacterianos, la determinación de la estructura de las proteínas y la ingeniería genética avanzada, muchas compañías farmacéuticas iniciaron nuevos enfoques basados en el diseño racional de fármacos. En ellos, se realizaron cribados masivos con colecciones de compuestos químicos para identificar inhibidores de proteínas esenciales para la viabilidad de las bacterias. No obstante, estas aproximaciones no tuvieron el éxito que se esperaba, de modo que el número de agentes antimicrobianos aprobados para su uso en clínica en las últimas décadas ha sufrido un fuerte descenso, al mismo tiempo que la creciente resistencia bacteriana a los antimicrobianos supone un problema de salud pública global (1).

1.2. PROBLEMÁTICA DE LA RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

La aparición y diseminación de **resistencia bacteriana a los antimicrobianos (AMR, antimicrobial resistance)** ha hecho que los antibióticos actuales resulten en muchos casos ineficaces (5). La AMR supone la pérdida de efectividad terapéutica de los compuestos antimicrobianos en el control y tratamiento de infecciones bacterianas, tanto en medicina humana como en veterinaria. Por ello, se ha convertido en una emergencia sanitaria según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las Naciones Unidas y la Unión Europea, entre otras muchas instituciones, de modo que se han diseñado programas de vigilancia y de optimización del uso de antimicrobianos, y promocionado medidas para el control de las infecciones (6).

Durante los últimos años se ha detectado un importante aumento en la incidencia de cepas bacterianas multirresistentes (MDR, del inglés *Multiple Drug Resistant*), lo que constituye una seria amenaza para la salud pública mundial (1). Algunos ejemplos son *Mycobacterium tuberculosis* (cepas MDR y XDR -*Extensively Drug Resistant*-) (7) o los denominados microorganismos “ESKAPE” (*Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*), destacados por ser los patógenos causantes de la mayoría de las infecciones hospitalarias en todo el mundo (2) (8).

A comienzos de 2018, la Sociedad Española de Enfermedades y Microbiología Clínica (SEIMC) realizó un estudio con el objetivo de conocer el impacto clínico real de las infecciones por bacterias MDR en España. Según los datos del trabajo, en España podría haber 180.600 pacientes anuales con infecciones por bacterias MDR, de los cuales 35.400 fallecerían (9).

En este escenario global, la OMS ha publicado una lista de patógenos prioritarios resistentes a los agentes antimicrobianos para tratar de guiar la investigación de nuevos compuestos con el objetivo de combatir el creciente problema mundial de la AMR (10).

Esta lista hace especial énfasis en la necesidad de nuevos antimicrobianos dirigidos, principalmente, frente a **bacterias Gram-negativas**. Esto se debe a que, a nivel mundial, está aumentando la incidencia de cepas resistentes a todos los antibióticos disponibles en el mercado. Debido a la baja permeabilidad de la membrana externa y a la expresión de bombas de eflujo con amplio espectro de drogas en la membrana interna, el descubrimiento de nuevos antimicrobianos que puedan atravesar esta barrera y permanecer en el interior celular supone un gran desafío (3).

Estas propiedades contribuyen a que la mayoría de las bacterias Gram-negativas sean intrínsecamente más resistentes a los antimicrobianos que las bacterias Gram-positivas (2). Actualmente, la mayor parte de antibióticos en ensayos clínicos dirigidos a bacterias Gram-negativas son modificaciones de las clases de antibióticos ya existentes, y solamente activos frente a un conjunto limitado de cepas resistentes (5), por lo que es imprescindible la investigación en nuevos tratamientos frente a estas bacterias.

La resistencia a agentes antimicrobianos en **bacterias Gram-positivas** ha cobrado una mayor importancia a raíz de la aparición de cepas *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) y *Enterococcus spp.* resistentes a vancomicina (VRE), entre otras (6). Aunque la aprobación comercial de nuevas clases de antibióticos, como oxazolidinonas (2000) y lipopéptidos (2003), ha aumentado las opciones terapéuticas para las bacterias Gram-positivas MDR, todavía se requieren nuevos tratamientos para anticiparse al desarrollo de resistencias frente a estos agentes antimicrobianos (5).

Las bacterias poseen una gran habilidad para desarrollar o adquirir resistencias a los agentes antimicrobianos una vez que éstos se incorporan al arsenal terapéutico. Un claro ejemplo de ello fue la precoz aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina en 1942, tan solo dos años después de su introducción en la práctica clínica, llegando a constituir una causa común de infecciones nosocomiales en 1950. Un fenómeno semejante ocurrió con la introducción de la meticilina (1961) -un derivado semi-sintético para el tratamiento de las cepas de *S. aureus* resistentes- pues rápidamente aparecieron las primeras cepas MRSA. De forma similar, sólo un año después de la comercialización de las primeras fluoroquinolonas sintéticas para el tratamiento de MRSA, el 80% de las cepas aisladas habían desarrollado resistencia (6),(11). Hasta hace poco, la vancomicina se consideraba el único tratamiento efectivo para estas cepas multirresistentes, pero su uso en exceso ha llevado a la aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina, denominadas VRSA (12). Por ello, es evidente que se necesitan nuevas clases de antibióticos con diferentes mecanismos de acción que sean eficaces contra MRSA y VRSA.

La **tuberculosis (TB)**, enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, sigue siendo hoy en día una de las 10 enfermedades más mortales para el ser humano y la enfermedad infecciosa que más muertes causa en el mundo entre las que tienen agente único (1,8 millones al año) (13).

El tratamiento estándar de la TB pulmonar consiste en la combinación de cuatro fármacos de primera línea (isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol) los dos primeros meses, e isoniazida y rifampicina durante cuatro meses más (14).

Sin embargo, este tratamiento no es apropiado contra las formas resistentes a fármacos de la enfermedad (MDR-TB y XDR-TB).

En los últimos años se han aprobado dos agentes antimicrobianos, bedaquilina (2012) y delamanida (2014), para el tratamiento de MDR-TB y XDR-TB. No obstante, poco después de su introducción en el mercado se informó sobre la aparición de resistencias a estos fármacos, por lo que es necesario investigar en nuevas terapias combinadas para tratar de prevenir el desarrollo de resistencias (15), (16). En la actualidad, hay siete compuestos para el tratamiento de TB en ensayos clínicos, y solo uno de ellos está en fase-3, lo cual supone un problema ya que el tratamiento de TB requiere una combinación de, al menos, tres agentes antimicrobianos (5).

Recientemente se ha observado un gran aumento de infecciones pulmonares causadas por **micobacterias no tuberculosas (MNT)** a nivel mundial, tanto en individuos inmunocomprometidos como inmunocompetentes (17). El término MNT hace referencia a todas las micobacterias distintas de *M. tuberculosis* complex y *M. leprae*, y son bacterias que se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente (17). En la actualidad, las MNT representan el 30-50 % del total de micobacterias aisladas en los laboratorios de microbiología, entre las que frecuentemente se encuentran *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. avium* complex (18).

A modo de ejemplo, *M. abscessus* constituye la causa más importante de infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística y enfermedades pulmonares crónicas (como bronquiectasias) (17). El tratamiento es de larga duración y a menudo complicado ya que las MNT son resistentes a la mayoría de los agentes antimicrobianos utilizados, lo que limita las opciones terapéuticas (19). Por ello, son necesarias nuevas alternativas para su tratamiento.

El problema de la resistencia a los antibióticos se ve agravado por las numerosas **dificultades técnicas** a las que se enfrentan las compañías farmacéuticas y laboratorios académicos en el proceso de descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos y de nuevas dianas farmacológicas, lo que ha llevado a un descenso de dichos compuestos tanto en fases de desarrollo como de ensayos clínicos o comercialización (6).

Asimismo, la industria farmacéutica ha perdido interés en el desarrollo de nuevos antibióticos debido al **elevado coste** que esto supone (tanto económico como de tiempo) y a la baja probabilidad de retorno de la **inversión** en comparación con otros fármacos destinados a enfermedades crónicas (como diabetes, trastornos psiquiátricos, etc.), pues los antibióticos se usan durante periodos relativamente cortos, a menudo son curativos y conviene limitar su uso para prevenir la aparición de resistencias.

De hecho, en el caso de los nuevos agentes antimicrobianos comercializados, éstos suelen reservarse para el tratamiento de un número reducido de pacientes y no se incluyen en la práctica habitual hasta varios años después de su aprobación, lo cual perjudica al sector farmacéutico en términos económicos (6). Es por ello que, hoy en día, sólo un número limitado de empresas como GlaxoSmithKline, Novartis, Merck y Roche siguen participando activamente en la investigación y el desarrollo de antimicrobianos, mientras que muchas otras (Bristol-Myers Squibb, Bayer, Eli Lilly) han abandonado este terreno (3).

Además de estos factores, hay que tener en cuenta los exigentes **requisitos regulatorios** relativos a los ensayos clínicos y a la aprobación de nuevos agentes antimicrobianos por las agencias del medicamento (6): AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios), EMA (Agencia Europea de Medicamentos) o FDA (*Food and Drug Administration*).

Aunque no hay una solución obvia a la aparición de resistencia a los antimicrobianos, a nivel internacional están surgiendo iniciativas enfocadas a impulsar el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos, como la iniciativa *10x'20* de la IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) en Estados Unidos para el desarrollo de 10 nuevos fármacos seguros, efectivos y sistémicos para el 2020 (20); la iniciativa público-privada *New Drugs for Bad Bugs* (ND4BB) iniciada en 2012, resultado de la colaboración entre la Comisión Europea y varias compañías farmacéuticas (21); o el nuevo plan iniciado por la Unión Europea en 2017 denominado “A European One Health Action Plan against AMR”.

1.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN BACTERIAS

1.3.1. RESISTENCIA INTRÍNSECA Y ADQUIRIDA

En el proceso de desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos es fundamental conocer los mecanismos moleculares de resistencia, tanto intrínseca como adquirida, a los antibióticos para diseñar nuevas moléculas o combinaciones con una actividad mejorada. Al conjunto de determinantes genéticos de resistencia a agentes antimicrobianos se le denomina **resistoma** (22).

La **resistencia intrínseca** (o natural) se produce debido a las características estructurales o funcionales inherentes de la bacteria.

Por ejemplo, la resistencia intrínseca de las bacterias Gram-negativas y las micobacterias a la mayoría de agentes antimicrobianos generalmente ha sido atribuida a la baja permeabilidad de su pared bacteriana, así como a los sistemas de eflujo.

Estos factores contribuyen a que las bacterias Gram-negativas sean resistentes naturales a muchos de los antibióticos que sí son efectivos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram-positivas (23).

Por otro lado, la **resistencia adquirida** se debe a procesos de mutación cromosómica o bien a la adquisición de genes de resistencia exógenos. Existen diversas estrategias a través de las cuales las bacterias pueden desarrollar o adquirir resistencia a los agentes antimicrobianos (véase **Figura 1**) (23) (24) (25):

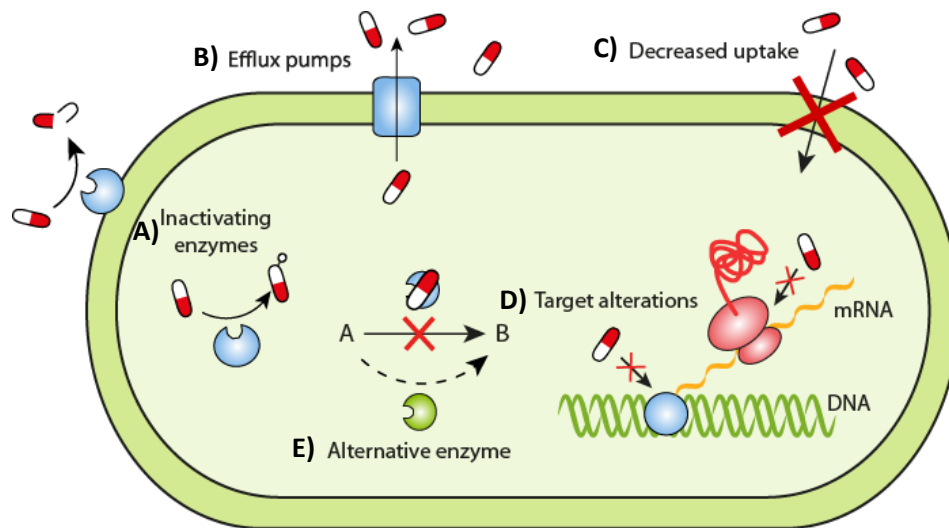


Figura 1. Mecanismos de resistencia a agentes antimicrobianos en bacterias.

A) Inactivación o modificación del fármaco. **B)** Expulsión activa del fármaco. **C)** Disminución de la entrada. **D)** Modificación de la diana, convirtiéndose en irreconocible para el fármaco. **E)** Desarrollo de ruta alternativa resistente. *Imagen tomada de E. Gullberg (25).*

- Inactivación o modificación enzimática de los antibióticos. Por ejemplo, acetilación de aminoglicósidos o hidrólisis del anillo β -lactámico por enzimas β -lactamasas.
- Alteración de la diana frente a la que está dirigido, convirtiéndose en irreconocible para el agente antimicrobiano. Esto puede darse tanto por mutaciones en el DNA cromosómico (por ejemplo, mutaciones en la RNA polimerasa que confieren resistencia a rifampicina), como por modificaciones enzimáticas (resistencia a macrólidos asociada a metilación de 23S rRNA).

- Desarrollo de una ruta metabólica resistente o *bypass* metabólico. Un ejemplo de ello es la resistencia a vancomicina, donde la expresión de cinco genes reemplaza el extremo acil-D-alanil-D-alanina de las cadenas de peptidoglicano de la pared celular por acil-D-alanil-D-lactato, impidiendo la unión de la vancomicina.
- Disminución de la acumulación del antibiótico en el lugar de acción, debido a alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa (principalmente, cambios en las porinas) o a un incremento del eflujo del antibiótico del interior celular, impidiendo que pueda llevar a cabo su función.

1.3.2. IMPLICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE BOMBAS DE EFLUJO

La expulsión de agentes antimicrobianos en bacterias mediante sistemas de bombas de eflujo fue descrita por primera vez a finales de los años 70 en *Escherichia coli*, con la eliminación de tetraciclinas mediante proteínas de membrana (26).

Las bombas de eflujo son transportadores de membrana implicados en la expulsión de sustancias tóxicas desde el interior celular, así como en la toma de nutrientes y en la comunicación entre células y el medio ambiente.

Aunque ciertas bombas de eflujo reconocen selectivamente ciertos sustratos (como las bombas Tet, que expulsan tetraciclinas), otras muchas son capaces de expulsar una gran variedad de compuestos no relacionados entre sí, de manera que proporcionan una amplia defensa para las bacterias y contribuyen al desarrollo de multirresistencia, tanto intrínseca como adquirida. Algunos ejemplos de bombas de eflujo que confieren multirresistencia son KexD en *K. pneumoniae* y LmrS en *S. aureus*, ambas descritas en los últimos años (23).

Además, se ha observado que las bacterias son capaces de transferir plásmidos con genes que codifican bombas de eflujo, de modo que este mecanismo de resistencia podría diseminarse rápidamente a otros patógenos relevantes (27).

En diversos estudios se ha visto que la combinación de **inhibidores de bombas de eflujo (EPIs, del inglés *Efflux Pumps Inhibitors*)** con agentes antimicrobianos hacen al microorganismo mucho más susceptible frente al fármaco, tanto *in vitro* como *in vivo* (15) (28). Por tanto, existe un gran interés por identificar EPIs de bacterias que, al utilizarlos en combinación con antibióticos, eviten su expulsión al exterior celular y, por consiguiente, mejoren la eficacia de los tratamientos (26) (28).

Entre los EPIs más estudiados se encuentran PAβN (phenilalanina-arginina-β-naftilamida), CCCP (carboxilciadina m-clorofenilhidrazona), REP (reserpina) y VER (verapamil), entre otros. Estos EPIs se utilizan en diversos estudios para adquirir información acerca del transporte de los antibióticos y la fuente de energía implicada en dicho transporte.

Por ejemplo, el **PAβN** es un EPI de amplio espectro, capaz de reducir significativamente la resistencia a fluoroquinolonas en *P. aeruginosa* mediante la inhibición de bombas de eflujo de la familia RND (del inglés, *resistance-nodulation-cell division*). Esta familia de transportadores, presente en bacterias Gram-negativas, expulsa una gran variedad de sustratos (confiriendo multirresistencia) y no tiene homólogos humanos. Por ello, se considera una diana importante para el desarrollo de EPIs destinados a aumentar la susceptibilidad bacteriana a antimicrobianos (23) (29).

En otros estudios realizados con modelos de ratón, se ha demostrado que el **verapamil** aumenta la actividad de la bedaquilina (BDQ) contra *M. tuberculosis* al impedir su eflujo del interior celular y protege frente a la aparición de mutantes resistentes a BDQ *in vivo* (30), (31). Además, se ha descrito que el verapamil restablece parcialmente la potencia de otros fármacos antituberculosos de primera línea, como rifampicina y etambutol, en experimentos realizados con ratones infectados con MDR-TB (32).

Otros inhibidores, como **CCCP**, alteran el gradiente de protones a través de la membrana citoplasmática de manera que eliminan la fuerza protón-motriz que es usada por muchas bombas de eflujo como fuente de energía, favoreciendo la acumulación de agentes antimicrobianos en las bacterias. La **reserpina** es un alcaloide vegetal que inhibe las bombas de eflujo dependientes de ATP (28).

En definitiva, la combinación de EPIs y agentes antimicrobianos se plantea como una estrategia prometedora para mejorar la eficacia de los tratamientos. Sin embargo, es importante considerar la toxicidad de dichos EPIs, aspecto que puede obstaculizar su aplicación clínica (26).

1.4. PROCESO DE DESCUBRIMIENTO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS (DRUG DISCOVERY)

Una de las principales soluciones a largo plazo a la crisis actual de agentes antimicrobianos es la continua investigación y desarrollo de nuevos compuestos, ya que la experiencia nos enseña que la efectividad de éstos una vez son comercializados depende completamente de la posible aparición de bacterias resistentes, que eventualmente ocurrirá.

El proceso de desarrollo de agentes antimicrobianos abarca las etapas iniciales de la investigación, donde se detectan nuevos hits, hasta la identificación de una molécula candidata con potencial para entrar en ensayos preclínicos y clínicos. A continuación, se detallan las fases iniciales del proceso de descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos.

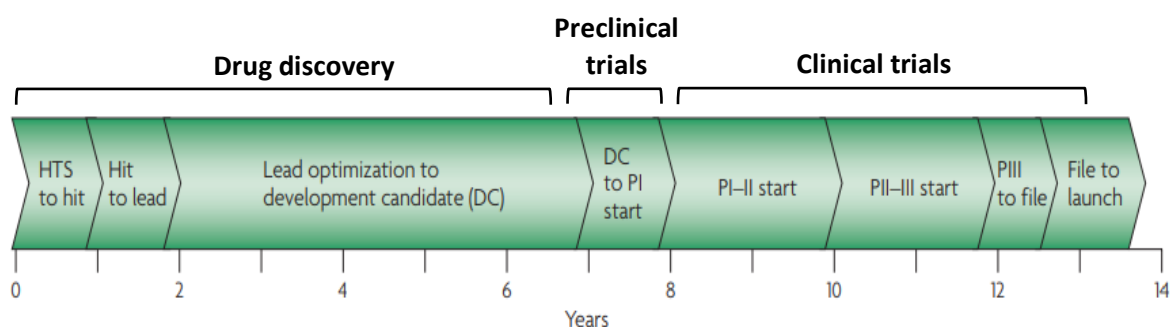


Figura 2. Línea del tiempo del desarrollo de agentes antibacterianos.

Se indica el tiempo aproximado (años) que conlleva cada etapa del descubrimiento de agentes antibacterianos, ensayos preclínicos y ensayos clínicos. La fase de optimización del *lead* es la que más tiempo requiere (4-5 años). Imagen adaptada de Payne DJ *et al.* (33)

1.4.1. Identificación y validación del *hit*

Durante las últimas dos décadas, las plataformas de cribado de alto rendimiento (HTS, del inglés *High Throughput Screening*) han sido ampliamente utilizadas como estrategia para la identificación inicial de *hits*, término que hace referencia a aquellas moléculas que presentan actividad *in vitro*. Las colecciones de compuestos empleadas en los cribados suelen contener alrededor de un millón de moléculas de bajo peso molecular, que pueden proceder de productos naturales, química combinatoria, productos comerciales, etc. Con el fin de mejorar las colecciones de compuestos y aumentar las probabilidades de éxito de los cribados, hay aproximaciones que tratan de generar librerías de compuestos de moléculas pequeñas con una mayor diversidad química y relevancia biológica, como *Diversity-Oriented Synthesis* (DOS) y *Biology-Oriented Synthesis* (BIOS) (34).

Además, existen otras estrategias que pueden complementar a HTS, como el diseño racional basado en fragmentos (FBDD, *Fragment-Based Drug Discovery*) y el cribado masivo virtual; en ambos es necesario conocer la estructura de la proteína diana (35).

Los **cribados de alto rendimiento** generalmente se han clasificado en dos categorías: ensayos frente a una diana determinada (o *target-based screens*), en los que se seleccionan compuestos que inhiben *in vitro* la proteína diana, y ensayos de células enteras (o *whole cell screens*), basados en la inhibición del crecimiento de las bacterias (36).

Los **ensayos frente a la proteína diana purificada** son específicos para la diana de interés (que ha tenido que ser previamente validada) y tienen como principal ventaja que el mecanismo de acción es conocido, lo que permite el diseño racional de fármacos. Sin embargo, esta estrategia se limita a aquellas dianas proteicas que puedan expresarse generalmente en hospedadores heterólogos como *Escherichia coli*, lo que también restringe la capacidad de ensayo ya que puede ocurrir que no se consiga purificar la proteína diana de interés. Además, los buenos inhibidores no siempre tienen actividad antibacteriana, dado que la permeabilidad y las características propias del huésped son factores que deben tenerse en cuenta (4) (37).

Aunque los ensayos frente a una diana cobraron un gran protagonismo con el desarrollo de técnicas genómicas, la mayoría de los compuestos identificados no han sido eficaces como agentes antibacterianos. Esto se debe a que los compuestos químicos ensayados no mostraban las propiedades físicas y químicas necesarias o no presentaban actividad antibacteriana, entre otros factores. Además, en la mayoría de los casos, las bacterias son capaces de desarrollar rápidamente resistencias a los inhibidores dirigidos frente a una diana única mediante la acumulación de mutaciones puntuales (1), (4).

Por otro lado, los **ensayos de células enteras** han sido muy importantes en el desarrollo de antibióticos, ya que la mayoría de clases antibacterianas utilizadas actualmente se descubrieron mediante estos ensayos en la “edad de oro”. En ellos, se ensayan a la vez todas las dianas del microorganismo en su contexto fisiológico, lo que permite identificar nuevas dianas previamente no descritas, y se seleccionan directamente compuestos con actividad antimicrobiana. Sin embargo, *a priori* el mecanismo de acción es desconocido por lo que, una vez se identifica un *hit*, hay que determinar la diana y confirmar el mecanismo de acción, aspecto que a menudo resulta laborioso (34) (37).

En la actualidad, se están desarrollando estrategias que combinan las ventajas de ambas aproximaciones, al mismo tiempo que minimizan sus inconvenientes. Por ejemplo, se están realizando ensayos de células enteras con cepas bacterianas que presentan los genes diana atenuados o sobreexpresados, lo cual proporciona información sobre la diana de los compuestos y su capacidad antimicrobiana (36).

Una vez identificados los *hits*, el principal objetivo es elegir los compuestos más adecuados teniendo en cuenta sus propiedades físicoquímicas, para seguir en las posteriores etapas. Es importante conocer si la estructura de los *hits* es susceptible a posteriores modificaciones y si los compuestos pueden sintetizarse fácilmente, lo cual es necesario para su futura producción a gran escala en los ensayos clínicos (38).

Asimismo, deben obtenerse datos que permitan definir qué elementos estructurales de los compuestos son esenciales para su actividad (SAR, *structure activity relationship*) (37), siendo deseable que los elementos estructurales clave sean diferentes para la actividad antibacteriana y la citotoxicidad.

1.4.2. Hit to lead

En esta etapa se realizan ensayos iniciales en los que se evalúa la actividad antimicrobiana de los *hits* en otras bacterias relevantes, siendo interesantes aquellas moléculas con valores bajos de concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a más de un patógeno de interés. También deben obtenerse resultados de citotoxicidad (p. ej. en líneas celulares de mamíferos) para evaluar posibles complicaciones futuras en el desarrollo de los compuestos.

Posteriormente, se llevan a cabo ensayos *in vitro* que aportan información relativa a la Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad (ADMET) de los compuestos, así como datos de sus propiedades físicoquímicas y farmacocinéticas (37). A modo de ejemplo, se estudia la capacidad de los compuestos para inhibir el citocromo P450, principal familia de enzimas implicada en el metabolismo de fármacos, cuya inhibición puede causar toxicidad. Otros estudios evalúan el potencial mutagénico de los compuestos mediante el test de Ames (39).

Desde el punto de vista microbiológico, es necesario definir el modo de acción de los compuestos frente a las bacterias mediante ensayos de cinética de muerte: bactericida (mata a los microorganismos diana) o bacteriostático (inhibe su crecimiento o replicación).

Finalmente, se analiza la frecuencia de generación de mutantes resistentes a los compuestos. A su vez, conviene comprender el mecanismo de acción de los mismos, por ejemplo, mediante estudios de secuenciación del genoma de los mutantes resistentes, ensayos de expresión génica, etc. de manera que el análisis de estos resultados permita proponer nuevas modificaciones químicas para mejorar la actividad y selectividad de las moléculas, a la vez que se reduce su toxicidad (38).

En esta etapa se reduce el número de compuestos (*hits*) que pasan a *lead*, término que hace referencia a moléculas obtenidas a partir de *hits* mediante programas de medicina química y que presentan actividad *in vitro* mejorada, propiedades fisicoquímicas optimizadas y buen perfil farmacocinético (38).

1.4.3. Optimización del *lead*

En esta etapa se realizan de nuevo programas de medicina química para mejorar la actividad y seguridad de los compuestos *lead*, hasta finalmente generar moléculas candidatas que puedan entrar en fases preclínicas. Los ensayos son similares a los descritos en la fase anterior, aunque deben cumplir criterios más estrictos. Por ejemplo, se realizan estudios de farmacocinética *in vivo*, generalmente en modelos de roedores, para determinar la concentración de compuesto en plasma y otros parámetros de interés. Los compuestos que finalmente van a progresar a los ensayos preclínicos, se vuelven a sintetizar a gran escala (37) (38).

1.4.4. Ensayos preclínicos y fases clínicas en humanos

En los ensayos preclínicos se evalúa si la molécula candidata es suficientemente segura y eficaz para su progresión a fases clínicas con humanos. Los datos obtenidos en estos ensayos deben orientar la pauta de administración (dosis, vía de administración, frecuencia) para las fases clínicas y pueden sugerir marcadores para monitorizar la seguridad. Además, informan sobre la ventana terapéutica, concepto que relaciona la dosis eficaz y la dosis segura, que debe ser amplia.

Por último, el paso de los ensayos preclínicos a las fases clínicas (fases I – IV) está sujeto a la obtención de la aprobación por parte de las agencias reguladoras pertinentes (como FDA y EMA).

2. ANTECEDENTES

Dado que el número de compuestos que finalmente entran en ensayos clínicos es muy bajo, se considera esencial invertir en las etapas iniciales del desarrollo de agentes antimicrobianos para mantener un número constante de moléculas que avanzan a etapas posteriores, hasta llegar a fases clínicas. Asimismo, es fundamental caracterizar de forma correcta las propiedades de los compuestos durante las fases de descubrimiento de fármacos para evitar posibles fracasos en los ensayos clínicos.

En un programa de cribado de compuestos realizado por el Dr. Santiago Ramón García -director de este Trabajo Fin de Máster- en la Universidad de British Columbia (UBC) en Canadá, se identificó una nueva serie química con potente actividad antimicrobiana. Posteriormente, UBC en colaboración con el Centre for Drug Research and Development (CDRD) inició un programa de medicina química en el que se generaron nuevos compuestos de esta serie química con mayor potencia y menor toxicidad. Gracias a este programa, se identificaron moléculas candidatas para su progresión en estudios preclínicos.

Al incorporarse el Dr. Santiago Ramón García al Grupo de Genética de Micobacterias (GGM) de la Universidad de Zaragoza (UNIZAR), se ha establecido una colaboración con UBC y CDRD para trabajar en la elucidación del modo de acción molecular de estos compuestos, aspecto que es necesario conocer durante las fases *hit to lead* del descubrimiento de nuevos antimicrobianos para posteriormente optimizar los compuestos *lead* que se pretenden progresar a fases preclínicas. Para ello, se ha firmado un acuerdo de transferencia de material (MTA, *Material Transfer Agreement*) por el cual CDRD provee a UNIZAR dichos compuestos. En el presente proyecto se pretende conocer mejor las propiedades de estos compuestos, y entre ellas, identificar el modo molecular de acción antimicrobiana.

Los compuestos utilizados durante este trabajo se denominan “compuestos CDRD” por proceder de una colaboración con CDRD, y se establece la siguiente enumeración (#1, #2, #3, #4, #6, #7, #8, #9) para su identificación durante los experimentos.

3. OBJETIVOS DEL TRABAJO

En base a los antecedentes expuestos, el presente Trabajo Fin de Máster se planteó con el **objetivo principal** de iniciar estudios que, a medio-largo plazo, llevasen a la elucidación del modo de acción molecular de la nueva serie química de compuestos identificada. Por tanto, este trabajo se enmarca en las fases *hit to lead* del desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

Para alcanzar este objetivo se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

- Caracterizar la actividad de los compuestos CDRD frente a *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA) y *Mycobacterium smegmatis* mc²155 mediante ensayos de determinación de su CIM y curvas de cinéticas de muerte.
- Determinar la actividad inhibitoria de los compuestos CDRD frente a otras bacterias (Gram-positivas, Gram-negativas y micobacterias).
- Evaluar la actividad de los compuestos CDRD en presencia de diversos inhibidores de bombas de eflujo (EPIs) en *S. aureus*, *M. smegmatis*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.
- Caracterizar la actividad de los compuestos CDRD en combinación con bedaquilina en *M. avium* y *M. abscessus*.
- Realizar diversos ensayos estándar de aislamiento de mutantes resistentes a los compuestos CDRD utilizando la cepa silvestre, y emplear una banca de mutantes por transposición en *M. smegmatis* HS42 para identificar mutantes resistentes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO. CONSERVACIÓN DE CEPAS

4.1.1. CEPAS BACTERIANAS

Las cepas bacterianas empleadas en este trabajo se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa bacteriana	Tipo	Características relevantes
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ATCC 39255	Gram +	Bacilo causante de la difteria
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Gram +	Pared similar a la de <i>Mycobacterium</i> , con ácidos micólicos más cortos
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	Gram +	Causa infecciones nosocomiales (tracto urinario, bacteriemia, etc.)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Gram -	Causa infecciones nosocomiales (tracto urinario, neumonía, etc.)
<i>Mycobacterium avium</i> ATCC 25291	Micobacteria	Causa infecciones pulmonares
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977	Micobacteria	Principal causa de infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística, bronquiectasias, etc.
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155 ATCC 700084	Micobacteria	Modelo subrogado no patógeno de <i>M. tuberculosis</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Micobacteria	Bacilo causante de la tuberculosis
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gram -	Cepa para investigación en patógenos oportunistas y para ensayos de susceptibilidad antimicrobiana
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA ATCC 29213	Gram +	Causa infecciones nosocomiales. Cepa para ensayos de susceptibilidad antimicrobiana y descubrimiento de antimicrobianos
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	Gram +	Infecciones graves (sepsis neonatal)

ATCC, *American Type Culture Collection* (Colección Americana de Cultivos Tipo)

En este estudio se utilizaron principalmente las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* MSSA y *Mycobacterium smegmatis* mc²155 con el fin de establecer las bases para identificar el modo de acción de los compuestos.

M. smegmatis se utilizó como modelo subrogado no patógeno de *M. tuberculosis*, ya que tienen muchas características en común y no requiere instalaciones con nivel de bioseguridad 3 (BSL 3). Además, *M. smegmatis* es una micobacteria de crecimiento rápido, por lo que tiene un tiempo de replicación de 2-5 horas, mientras que *M. tuberculosis* -micobacteria de crecimiento lento- presenta un tiempo de duplicación de 15-20 h. Esta característica permite obtener resultados de forma más rápida, ya que *M. smegmatis* alcanza la fase estacionaria en solo 2-3 días (comparado con 7-10 días para *M. tuberculosis*). Sin embargo, estos tiempos son largos si los comparamos con *S. aureus*, que alcanza la fase estacionaria en aproximadamente 24 h. Este aspecto fue de vital importancia en el planteamiento de los experimentos, como se comenta más adelante.

El resto de cepas bacterianas incluidas en la **Tabla 1** se utilizaron para determinar el perfil de susceptibilidad de los diferentes compuestos antimicrobianos.

Todas las cepas empleadas en este estudio requieren instalaciones con nivel de bioseguridad 2 (BSL 2), excepto *C. glutamicum* y *M. smegmatis* (BSL 1) y *M. tuberculosis* (BSL 3). Por este motivo, los ensayos con *M. tuberculosis* se realizaron en colaboración con la Dra. Ainhoa Lucía (Universidad de Zaragoza, España).

4.1.2. MEDIOS DE CULTIVO

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se cultivaron en medio líquido Mueller-Hinton II Broth Cation Adjusted (MH II) (BD BBL) suplementado con 22 mg/L de Ca^{2+} y 12 mg/L de Mg^{2+} , dado que es el medio recomendado para la realización de ensayos de susceptibilidad a agentes antimicrobianos (40). Asimismo, se emplearon los medios sólidos agar MH II (PanReac AppliChem) y agar Luria Bertani (LB). El agar LB está compuesto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de cloruro sódico y 15 g/L de agar.

Las cepas *M. avium*, *M. abscessus* y *M. tuberculosis* se cultivaron en medio Middlebrook 7H9 (BD Difco) suplementado con 10 % de Middlebrook-ADC (0.2% dextrosa, 0.5% fracción V albúmina sérica bovina, 0.0003% catalasa bovina) (BD Difco) y 0,2 % de glicerol (Scharlau) para los ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos, ya que es el medio de referencia en las micobacterias.

4.1.3. CONDICIONES GENERALES DE CULTIVO

Los cultivos y placas se incubaron en condiciones aeróbicas (en estático) a 37 °C (Heraeus HeraCell Incubator), temperatura óptima de crecimiento para todas las cepas bacterianas de este trabajo.

4.1.4. CONSERVACIÓN DE CEPAS

Para la preservación de cepas se tomaron alícuotas de cultivos líquidos en fase estacionaria (20-24 h para *S. aureus*; 3-4 días para *M. smegmatis*), se añadió glicerol a una concentración final del 15 % y se congelaron a -20°C.

Una de las alícuotas congeladas se empleó para determinar la densidad bacteriana de los viales preparados, expresada como UFC/mL (UFC, unidad formadora de colonias). Para ello, se realizaron diluciones seriadas 1/10 en tubos Eppendorf con PBS 1x (del inglés, *Phosphate Buffered Saline*) y se sembraron por duplicado 100 µL de las diluciones 10⁻⁵-10⁻⁸ en placas de Petri con agar LB.

En el caso de *M. smegmatis*, las diluciones se hicieron en PBS suplementado con 0,1% de Tyloxapol, detergente que favorece la disgregación de los agregados típicos en cultivos de micobacterias debido a las características hidrofóbicas de su pared celular.

Se realizaron recuentos de colonias tras incubar las placas a 37 °C durante 24 h (*S. aureus*) o 3-4 días (*M. smegmatis*). Teniendo en cuenta la dilución y el volumen depositado en las placas de Petri, se determinó la densidad bacteriana de los viales congelados.

Para cada uno de los experimentos llevados a cabo se utilizaron viales que no habían sufrido ciclos de descongelación previos, con el fin de evitar alteraciones en la viabilidad de las bacterias.

4.2. COMPUESTOS

En la **Tabla 2** se recogen los agentes antimicrobianos empleados en el desarrollo del trabajo, el disolvente utilizado y la referencia. Éstos se prepararon a una concentración final de 10 mg/mL y se conservaron convenientemente alicuotados a -20 °C.

Tabla 2. Agentes antimicrobianos utilizados en este trabajo, disolvente y referencia.

Agente antimicrobiano (abreviación)	Disolvente	Referencia
Bedaquilina (BDQ)	DMSO	AURUM Pharmatech
Compuestos CDRD	DMSO	CDRD
Carboxilciadina m-clorofenilhidrazona (CCCP)	DMSO	Sigma-Aldrich
Isoniazida (INH)	DMSO	Sigma-Aldrich
Phenilalanina-arginina-β-naftilamida (PAβN)	Agua	Sigma-Aldrich
Reserpina (REP)	DMSO	Sigma-Aldrich
Rifampicina (RIF)	DMSO	Sigma-Aldrich
Verapamil (VER)	Agua	Sigma-Aldrich

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS

4.3.1. DETERMINACIÓN DE LA CIM POR MICRODILUCIÓN

La determinación de la susceptibilidad de las distintas cepas bacterianas a los compuestos CDRD y otros agentes antimicrobianos (**Tabla 2**) se realizó de acuerdo con los estándares del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (40). Todos los experimentos se realizaron por duplicado dentro de la misma placa, y siempre incluyeron los controles pertinentes: positivo (células sin ningún compuesto añadido) para evaluar el crecimiento normal de las cepas, y negativo (medio de cultivo sin inocular) para confirmar que el experimento se realizó en condiciones estériles.

Se prepararon disoluciones de los agentes antimicrobianos en medio de cultivo MH II al doble de la concentración máxima que se deseaba ensayar. Tras ello, se hicieron diluciones seriadas 1:2 de los compuestos en medio MH II, en placas de 96 pocillos, con un volumen final de 75 μL por pocillo. Posteriormente, a partir de los viales de congelación, se prepararon cultivos líquidos ($2 \cdot 10^5$ UFC/mL) de los distintos microorganismos y 75 μL de esta suspensión se añadieron a cada pocillo de la placa. De este modo, la densidad final de bacterias fue aproximadamente 10^5 UFC/mL.

Una vez inoculadas, las placas de 96 pocillos se incubaron a 37 °C sin agitación durante 20-24 h para todas las cepas utilizadas, a excepción de las micobacterias (*M. smegmatis*, *M. avium* y *M. abscessus*, 2-3 días; *M. tuberculosis*, 6-7 días). Posteriormente, se añadieron 30 μL de MTT (5 mg/mL) suplementado con Tween 80 al 20% a cada pocillo (41), observándose el resultado tras diferentes tiempos de incubación a 37 °C en función de la cepa utilizada.

El MTT (color amarillo) es un indicador de la actividad metabólica y, por tanto, del crecimiento bacteriano, ya que las bacterias metabólicamente activas reducen dicho compuesto a formazan (producto con color violeta). La CIM se define como la concentración más baja de agente antimicrobiano a la que se inhibe el crecimiento visible del microorganismo bajo las condiciones de ensayo definidas. En este caso, corresponde con la concentración mínima de compuesto a la que no se produce el viraje de color de amarillo a violeta. De este modo, se trata de un método colorimétrico cuantitativo que permite determinar la actividad antimicrobiana de los compuestos ensayados.

Finalmente, se determinó la absorbancia del MTT reducido a 580 nm con el espectrofotómetro de placas Synergy HT (BioTek). Con estas medidas se calculó el % de crecimiento en función de la concentración de agente antimicrobiano, lo que permitió representar curvas de dosis-respuesta para determinar los valores de CIM.

4.3.2. DETERMINACIÓN DE LA CIM EN MEDIO SÓLIDO

Los experimentos de selección de bacterias resistentes a agentes antimicrobianos mediante la estrategia estándar, realizados en agar MH II, suelen requerir una elevada densidad de bacterias (**Apartados 4.5.1, 4.5.2 y 4.5.4**). Por ello, previamente fue necesario realizar ensayos de susceptibilidad en medio sólido para analizar si la actividad de los compuestos variaba en función del número de células sembradas. Además, otro motivo es que los valores de CIM en líquido no siempre se corresponden con los determinados en medio sólido (42).

En primer lugar, se prepararon placas de 24 pocillos con concentraciones seriadas 1:2 de los agentes antimicrobianos a ensayar (1 mL de agar MH II por pocillo), de forma que cada pocillo de la placa presentaba una concentración distinta del compuesto. Es importante que el medio sólido esté todavía fundido pero atemperado (55°C) cuando entra en contacto con los compuestos para evitar la descomposición térmica de éstos. Las placas preparadas se guardaron a 4 °C durante 24 horas para favorecer la difusión de los compuestos en el agar.

Posteriormente, la actividad de los compuestos se evaluó ante diferentes inóculos de *S. aureus* y *M. smegmatis*: 10^3 , 10^5 y 10^7 UFC/pocillo. Puesto que se sembraron 10 µL en cada pocillo, fue necesario preparar suspensiones bacterianas con 10^5 , 10^7 y 10^9 UFC/mL. Para ello, se midió la DO_{600nm} de cultivos líquidos de *M. smegmatis* o *S. aureus* en fase de crecimiento logarítmico y, teniendo en cuenta la relación previamente establecida entre DO_{600nm} y UFC/mL, se tomó el volumen de cultivo necesario. En *S. aureus*, se asume que $DO_{600nm} = 0,44$ equivale a $1,8 \cdot 10^8$ UFC/mL; en *M. smegmatis*, $DO_{600nm} = 0,125$ es 10^7 UFC/mL.

Tras incubar las placas a 37 °C durante 24 h para *S. aureus* o 3-4 días para *M. smegmatis*, se pudo determinar la CIM como la concentración más baja de compuesto que inhibe el crecimiento bacteriano, en la cual no hay formación de colonias.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado acompañados de los controles pertinentes: positivo (inóculo sin compuesto) y negativo (medio de cultivo sin inocular).

De forma paralela al ensayo de susceptibilidad, se sembraron (por duplicado) en agar LB diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas y se realizaron recuentos de colonias para confirmar que el número de bacterias en cada pocillo era el deseado.

4.3.3. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE MUERTE

Este método se emplea fundamentalmente en el estudio de nuevos agentes antimicrobianos para determinar si la actividad de los compuestos es bactericida (reducción en $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL el nivel de inóculo inicial) o bacteriostática (el inóculo inicial se mantiene constante), así como para determinar el sinergismo/antagonismo de la combinación de dos o más sustancias administradas conjuntamente.

El procedimiento comenzó con la preparación de cultivos líquidos de *S. aureus* o *M. smegmatis* (bacterias procedentes de los viales de congelación) en medio líquido MH II a una densidad de 10^5 UFC/mL (salvo en determinadas ocasiones, especificadas en el **Apartado 5.1.2.3**).

Los cultivos se incubaron a 37 °C durante diferentes tiempos antes de añadir los compuestos para evaluar la actividad de los mismos en cultivos en fase exponencial (*S. aureus*, 1-3 h; *M. smegmatis*, 20-24 h) y en fase estacionaria (*S. aureus*, 24 h; *M. smegmatis*, 7 días). En ciertos experimentos, los compuestos se añadieron sin incubación previa de los cultivos (preparados directamente a partir de los viales de congelación).

A continuación, estos cultivos se distribuyeron en tubos de vidrio estériles o bien en frascos de cultivo de 25 cm², y los compuestos se añadieron a diferentes concentraciones (superiores, inferiores o iguales a la CIM determinada en líquido). En todos los casos se incluyó un cultivo control (sin compuesto) para seguir el crecimiento de la bacteria en ausencia de agente antimicrobiano. Los cultivos se incubaron a 37 °C.

A diferentes tiempos, se sembraron (por duplicado) en agar LB diluciones seriadas de los cultivos. Las placas se cultivaron a 37°C durante 24 h (*S. aureus*) o 3-4 días (*M. smegmatis*) antes de realizar el recuento de colonias.

De forma paralela a los estudios de cinética de muerte, se determinó la CIM de los compuestos en medio líquido para verificar que su actividad se mantenía constante.

4.4. MÉTODOS DE ENSAYO DE COMBINACIONES ANTIMICROBIANAS

4.4.1. EVALUACIÓN DE COMBINACIONES MEDIANTE CIM EN LÍQUIDO

Para evaluar la actividad de determinados compuestos CDRD en presencia de concentraciones sub-inhedoras de ciertos EPIs, tales como PAβN, CCCP, VER y REP, se siguió el procedimiento de determinación de CIM por microdilución descrito en el **Apartado 4.3.1**, pero introduciendo ligeras modificaciones.

Estos experimentos se realizaron con las cepas *S. aureus*, *M. smegmatis*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, debido al interés que podían tener los resultados obtenidos a partir de estos ensayos.

Previamente, fue necesario determinar la CIM (por microdilución) de los EPIs en las cepas bacterianas mencionadas anteriormente. Tras ello, se evaluó la CIM en líquido de los compuestos CDRD en presencia de concentraciones sub-inhedoras de los EPIs para asegurar que los EPIs no afectaban por sí mismos la viabilidad de las bacterias. Para ello, se prepararon diluciones seriadas 1:2 de los compuestos CDRD en placas de 96 pocillos, como se ha descrito en el **Apartado 4.3.1**, y en el mismo inóculo se añadieron los EPIs al doble de la concentración final deseada.

A su vez, también se determinó la CIM de los EPIs y de los compuestos CDRD por separado. Finalmente, se analizó si la CIM de los compuestos CDRD había variado en función de la presencia de los EPIs en el medio y de la concentración final de éstos.

4.4.2. ENSAYO DE CHECKERBOARD

Uno de los métodos más utilizados para estudiar el efecto *in vitro* de combinaciones de compuestos es el ensayo de tablero de ajedrez (o *checkerboard* en inglés). Esta técnica permite evaluar la interacción entre dos compuestos frente a una cepa bacteriana determinada. En este trabajo, se utilizó para analizar la actividad de ciertos compuestos CDRD -especificados en el **Apartado 5.1.5**- en combinación con bedaquilina frente a *M. avium* y *M. abscessus*.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos. Se hicieron diluciones seriadas 1:2 del compuesto A (bedaquilina) en el eje X, y del compuesto B (compuestos CDRD) en el eje Y, de modo que los pocillos de la placa formaron un tablero con las múltiples diluciones seriadas de los agentes antimicrobianos. Además, en las mismas placas se incluyeron diluciones seriadas de los compuestos solos para determinar la CIM de los mismos por separado. Después, las placas se inocularon a una densidad final de 10^5 UFC/mL y se cultivaron a 37 °C durante 2 días antes de añadir el MTT (indicador de crecimiento bacteriano). La absorbancia del MTT reducido se determinó tras un día de incubación.

Los experimentos se realizaron por duplicado en diferentes días. Previamente fue necesario calcular las CIM de ambos agentes antimicrobianos por separado para conocer el rango de concentraciones a emplear en los experimentos.

Para evaluar el efecto de la combinación de los dos agentes antimicrobianos se calculó la Concentración Inhibitoria Fraccionaria (FIC), que viene definida por la siguiente expresión:

$$FIC_A = \frac{CIM \text{ de } A \text{ en presencia de } B}{CIM \text{ de } A \text{ solo}}$$

A partir de estos valores, se calculó el índice FIC (FICI) como $\sum FIC = FIC_A + FIC_B$

El índice FICI indica de manera objetiva si hay sinergia, antagonismo o no existe interacción entre los compuestos (véase **Figura 3**) (43).

Además, se representaron los valores FIC_A frente a los valores FIC_B en isobogramas para determinar la forma de la curva, de manera que la interacción es más sinérgica cuanto más se aproxima la curva al origen (véase **Figura 3**) (44).

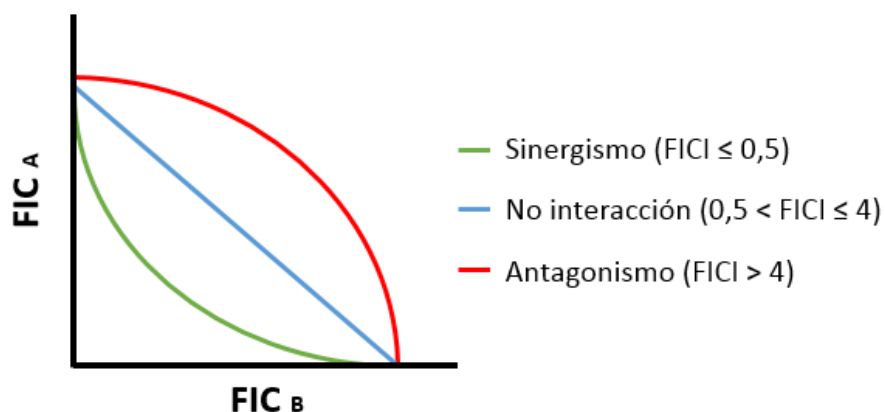


Figura 3. Representación esquemática de los posibles perfiles de interacción.

Se indica el efecto de la combinación (sinergismo, no interacción o antagonismo) con su correspondiente valor FICI y perfil de interacción.

4.5. APROXIMACIONES PARA LA SELECCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES Y CONFIRMACIÓN DEL PERFIL DE RESISTENCIA

La identificación de mutaciones genómicas (como polimorfismos de nucleótido único -SNPs- o inserciones/deleciones) que están asociadas a la resistencia a un determinado compuesto, puede ayudar a identificar la diana sobre la que actúa dicho compuesto. Por este motivo, se considera necesario aislar mutantes resistentes a los agentes antimicrobianos y, posteriormente, confirmar mediante secuenciación completa del genoma que la resistencia se debe a cambios genotípicos y no a la adquisición de un fenotipo de resistencia transitorio (tolerancia) debido a la expresión de genes de resistencia inducibles por los compuestos.

4.5.1. PLACAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COMPUESTO

En esta estrategia de selección de mutantes resistentes a los compuestos se expuso a *S. aureus* ante diversas concentraciones inhibitorias (4 y 10 veces la CIM) del compuesto CDRD #1 y de rifampicina (antimicrobiano que actuó como control de la técnica), tomándose como referencia los valores de CIM previamente determinados en agar MH II (**Apartado 4.3.2**). Asimismo, se prepararon placas de Petri sin agente antimicrobiano que sirvieron como control. En estos experimentos se sembraron 100 μ L por placa con 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC totales, siguiendo el procedimiento descrito en el **Apartado 4.3.2**.

De forma paralela, se sembraron (por duplicado) en agar LB diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas preparadas. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y, posteriormente, se realizaron recuentos de colonias para poder estimar la frecuencia de aparición de mutantes resistentes, definida como el cociente entre el número de colonias resistentes (en agar MH II suplementado con los agentes antimicrobianos) y el número total de colonias (en agar MH II sin antimicrobiano).

4.5.2. PLACAS CON GRADIENTE DE CONCENTRACIÓN DEL COMPUESTO

La selección de mutantes resistentes es posible en un rango de concentraciones específicas, que van desde valores cercanos a la CIM de la población bacteriana sensible hasta la concentración que impide el crecimiento de mutantes resistentes, conocida como CPM (del inglés, *Mutant Prevention Concentration*). A este rango se le denomina ventana de selección (del inglés, *mutant selection window*) (45). Por ello, también se empleó esta aproximación en *S. aureus* para la selección de mutantes resistentes, la cual incluye un rango de concentraciones y no únicamente dos valores fijos.

Para preparar las placas de Petri con un gradiente de concentración de 0 a 10 veces la CIM, se diluyó el compuesto en agar MH II (fundido y atemperado) a una concentración final de 10xCIM. Este agar se añadió sobre placas de Petri inclinadas (**Fig. 4 A**), posición que mantuvieron hasta su solidificación (**Fig. 4 B**). Tras ello, se dispusieron en posición horizontal y se vertió agar MH II sin agente antimicrobiano sobre las placas con el agar previamente solidificado (**Fig. 4 C**). Esto se hizo con el objetivo de que se generase el gradiente de concentración del agente antimicrobiano (**Fig. 4 D**). De esta manera, en una misma placa se tuvo todo el rango de concentraciones entre 0 y 10xCIM. Las placas preparadas se guardaron a 4 °C durante 24 h para que los compuestos difundieran en el agar.

Se sembraron 100 μL de una única densidad celular (10^8 UFC/placa) y se llevó a cabo el mismo procedimiento que se ha descrito en el **Apartado 4.5.1**.

Cabe señalar que los mutantes resistentes deberían encontrarse en la intersección entre la zona de crecimiento y la zona de inhibición del agente antimicrobiano.

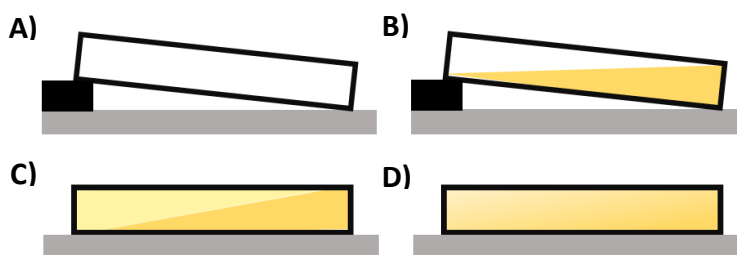


Figura 4. Procedimiento para la preparación de placas con gradiente de concentración. *Amarillo intenso: alta concentración de compuesto; amarillo débil: menor concentración.*

4.5.3. CURVAS DE CINÉTICA DE MUERTE CON ADICIÓN DE COMPUESTO A DIFERENTES TIEMPOS

Esta estrategia de selección de mutantes se basa en el procedimiento detallado en el **Apartado 4.3.3**.

En ciertas ocasiones, las curvas de cinética de muerte pueden experimentar un aumento del número de bacterias (o “repunte”) tras un periodo de muerte inicial, lo cual podría deberse a un enriquecimiento de la población de bacterias resistente a los compuestos. Una manera de comprobarlo consiste en volver a añadir el compuesto para ver si (1) se reduce el número de UFC -indicando que la población es sensible al compuesto- o (2) sigue aumentando el número de bacterias debido a la generación de mutantes resistentes a los compuestos.

Para hacer estos experimentos se prepararon dos replicados biológicos, y se añadió el compuesto a tiempo 0. Tras ello, se volvió a añadir compuesto solo a uno de los cultivos (en *S. aureus*, a las 24 h; en *M. smegmatis*, a las 48 h). Se seleccionaron colonias procedentes de aquellos cultivos que habían reanudado su crecimiento tras un periodo de muerte inicial y se cultivaron en medio líquido para posteriormente confirmar el perfil de resistencia mediante determinación de CIM en líquido.

4.5.4. BANCA DE MUTANTES POR TRANSPOSICIÓN

Como última aproximación para aislar mutantes resistentes a los compuestos, se utilizó una banca de mutantes por transposición en *M. smegmatis* HS42 generada previamente por Ainhoa Lucía (46), perteneciente al GGM.

Esta librería se construyó con el transposón TnSPAZ (véase **Figura 5**), que contiene los siguientes elementos: el gen de la transposasa (*tnpA*) y las repeticiones invertidas (IR) del transposón IS1096 de *M. smegmatis*, el gen de resistencia a kanamicina (*aph*) de Tn903, y un promotor fuerte derivado del gen β -lactamasa de *Mycobacterium fortuitum* (*pBlaF**). Dicho promotor fuerte está orientado hacia el exterior, por lo que el transposón TnSPAZ, además de inactivar genes por inserción, también puede sobreexpresar aquellos genes que se encuentran adyacentes a su sitio de inserción. De esta manera, esta estrategia permite detectar genes que desencadenan resistencias frente a los compuestos al ser inactivados o sobreexpresados.

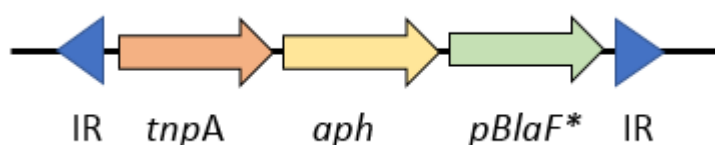


Figura 5. Representación esquemática del transposón TnSPAZ

Esta banca, que contiene todos los mutantes agrupados, fue verificada y analizada en la Tesis Doctoral de Ainoa Lucía en busca de mutantes resistentes a diferentes agentes antimicrobianos, entre los que se encuentran los principales antituberculosos de primera y segunda línea (46).

Para llevar a cabo este ensayo, se sembraron 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC totales de la banca en placas con agar MH II suplementado con concentraciones de compuesto CDRD #9 superiores al valor de CIM obtenido en medio sólido para la cepa silvestre. Como control de la funcionalidad de la banca se empleó isoniazida, ya que la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a dicho antibiótico está descrita (46).

Si mediante cualquiera de las aproximaciones descritas en el presente **Apartado 4.5** aparecen colonias resistentes a los compuestos, éstas se cultivan en medio líquido MH II sin el compuesto y se determina la CIM mediante microdilución (**Apartado 4.3.1**) para verificar el fenotipo de resistencia adquirido, utilizando como control de susceptibilidad la cepa silvestre. Aquellas cepas de interés (p. ej., por presentar mayor CIM respecto a la cepa silvestre) se preservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en glicerol al 15%.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS

5.1.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS MSSA

5.1.1.1. DETERMINACIÓN DE LA CIM POR MICRODILUCIÓN

La actividad antimicrobiana de los compuestos CDRD frente a *S. aureus* MSSA (ATCC 25923) se determinó en medio líquido (**Tabla 3**). Además, se incluyó rifampicina (RIF) como control de sensibilidad de la cepa, cuyo valor de CIM está descrito (47).

Tabla 3. CIM de los compuestos CDRD y RIF frente a *S. aureus*, determinada en medio líquido MH II. Se muestran los resultados de dos replicados técnicos. RIF: rifampicina

Cepa bacteriana	CIM líquido (µg/mL)								
	#1	#2	#3	#4	#6	#7	#8	#9	RIF
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA	2	2	4	2	8	>8	8	8	0,002

Como se recoge en la **Tabla 3**, la CIM determinada para rifampicina coincide con el valor descrito (en torno a 0,0016 µg/mL) (47), lo que verifica que los resultados de susceptibilidad obtenidos para los compuestos CDRD son precisos.

Todos los compuestos CDRD ensayados presentaron actividad antibacteriana frente a *S. aureus* en un rango de concentraciones entre 2 y 8 µg/mL, excepto el compuesto #7 (> 8 µg/mL). Entre ellos, los compuestos #1, #2 y #4 mostraron un menor valor de CIM, indicando que podrían ser los compuestos CDRD más activos frente a *S. aureus*.

Como se ha comentado, este Trabajo Fin de Máster se enmarca en una colaboración con CDRD, centro que provee los compuestos al GGM. Como se trata de compuestos procedentes de una misma serie química, asumimos que todos ellos deben presentar el mismo mecanismo de acción. Por tanto, al disponerse de una mayor cantidad de los compuestos #1 y #9 en comparación con el resto para llevar a cabo los objetivos propuestos, se continuaron los experimentos en *S. aureus* con #1 y #9.

5.1.1.2. DETERMINACIÓN DE LA CIM EN MEDIO SÓLIDO

Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana en medio sólido permitieron evaluar si la actividad de los compuestos #1 y #9 variaba en función del número de células sembradas (10^3 , 10^5 y 10^7 UFC totales).

En todas las condiciones ensayadas se obtuvo una CIM en sólido de 4 µg/mL (**Tabla 4**), por lo que los valores no variaron significativamente con respecto a los determinados en medio líquido (**Tabla 3**). Estos resultados indicaron que la actividad de los compuestos #1 y #9 era independiente del número de células totales sembradas, lo cual facilitó el planteamiento de los experimentos de aislamiento de mutantes resistentes a los compuestos -que suelen requerir una elevada densidad celular-. No obstante, mientras que el compuesto #1 inhibió completamente el crecimiento bacteriano a concentraciones iguales o superiores a 4 µg/mL en todas condiciones ensayadas, en los pocillos correspondientes a 4 µg/mL del compuesto #9 se observó un ligero crecimiento de bacterias (véase **ANEXO I**). Por tanto, estos resultados podrían indicar que #1 es más efectivo que #9 frente a *S. aureus*.

Tabla 4. CIM en sólido de los compuestos CDRD #1 y #9 así como de RIF en función del número de UFC totales (10^3 , 10^5 y 10^7). Se muestran los resultados de dos replicados técnicos.

UFC totales	CIM sólido (µg/mL)		
	#1	#9	RIF
10^3	4	4	0,008
10^5	4	4	0,016
10^7	4	4	>0,062

Asimismo, se determinó la CIM en sólido de rifampicina, antibiótico que se empleó posteriormente como control en los experimentos de selección de mutantes resistentes. Como resultado, al sembrar 10^3 UFC totales se obtuvo un valor de CIM de 0,008 µg/mL, similar al calculado en medio líquido. Sin embargo, al sembrar 10^5 y 10^7 UFC totales se observó un ligero crecimiento de colonias a concentraciones superiores a 0,008 µg/mL. Este incremento en la CIM pudo deberse al aumento del número de células sembradas, o bien a la selección de mutantes (como se describe en el **Apartado 5.2.1**).

5.1.1.3. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE MUERTE

Se realizaron estudios de cinética de muerte para determinar el modo de acción de los compuestos (bactericida o bacteriostático), aspecto que debe conocerse durante las fases *hit to lead* del desarrollo de nuevos compuestos.

En la **Figura 6 A y B** se muestran las curvas de cinética de muerte obtenidas al añadir los compuestos CDRD #1 y #9, respectivamente, tras 1 h de incubación de los cultivos a 37°C, -cuando las bacterias se han adaptado a las condiciones de cultivo durante la fase de latencia-. En ellas se observa que el crecimiento de *S. aureus* no se vio alterado en presencia de los compuestos #1 o #9 a 0,5 y 1 µg/mL (concentraciones inferiores a la CIM).

Al aumentar la concentración a 4 $\mu\text{g/mL}$, se produjo una ligera disminución del número inicial de UFCs en los dos casos (aproximadamente, 1 \log_{10} UFC/mL), pero tras 4-8 h se reanudó el crecimiento.

En ambos casos se detectó una inhibición completa del crecimiento bacteriano tras 8 horas de incubación en presencia de 32 $\mu\text{g/mL}$ de los compuestos. En concreto, se produjo una reducción de 2 \log_{10} UFC/mL -máxima disminución de UFCs que se pudo obtener debido al límite de detección de la técnica utilizada-. Esto mismo se observó a 16 $\mu\text{g/mL}$ de compuesto #9 tras 24 h. Sin embargo, aunque el compuesto #1 a 16 $\mu\text{g/mL}$ redujo el número de UFCs durante 8 h, posteriormente se detectó una reanudación del crecimiento. Esto podría deberse a la selección de mutantes por cambios genotípicos o bien a la adquisición de un fenotipo de resistencia transitorio (tolerancia) debido a la expresión de genes de resistencia inducibles por los compuestos.

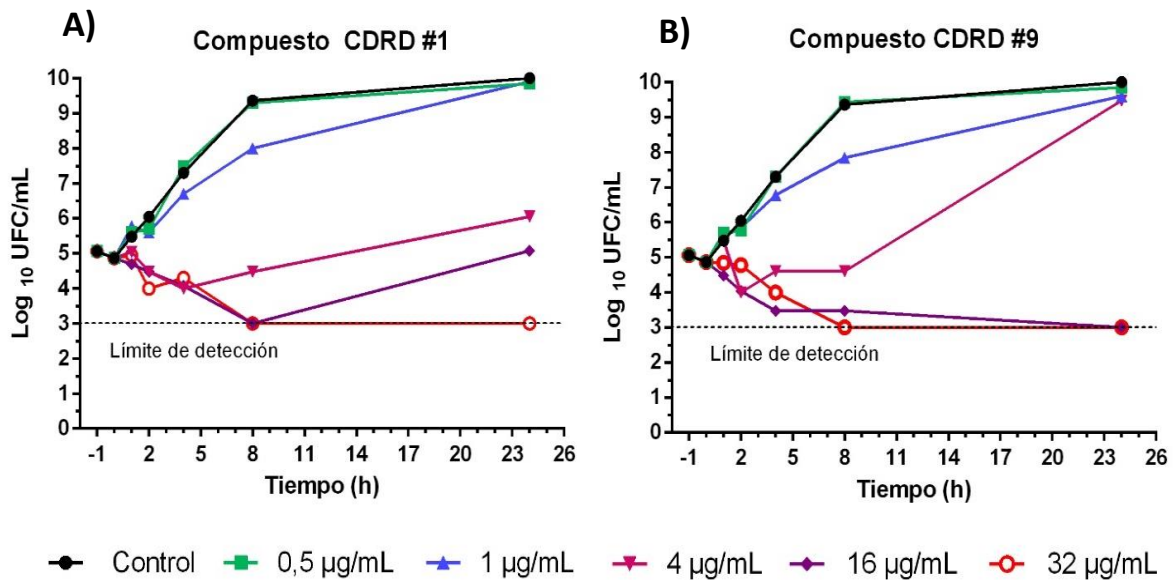


Figura 6. Curva de cinética de muerte en *S. aureus*, con adición de compuesto CDRD #1 (A) o CDRD #9 (B). Las bacterias se sembraron a 10^5 UFC/mL y se incubaron a 37°C durante 1 h antes de añadir los compuestos a las concentraciones indicadas. Se muestra la media de dos replicados técnicos. El límite de detección en este experimento fue 3 \log_{10} UFC/mL.

A la vista de los resultados, se puede concluir que ambos compuestos presentan un modo de acción similar. No obstante, teniendo en cuenta que el compuesto #1 pareció ser más efectivo que el #9 frente *S. aureus* en los ensayos de determinación de CIM en medio sólido (**Apartado 5.1.1.2**), las curvas de cinética de muerte posteriores (con adición de compuesto a diferentes tiempos) se realizaron únicamente con el compuesto #1.

En las curvas de cinética de muerte con adición de compuesto a diferentes tiempos (**Figura 7**) se emplearon dos replicados biológicos; a ambos se les añadió el compuesto #1 tras 3 h de incubación (correspondiente a $t = 0$ h en la **Figura 7**) con el fin de analizar su actividad frente a cultivos en fase exponencial (metabólicamente activos). A las 24 h se añadió de nuevo el compuesto #1 (a 2 o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a uno de los replicados biológicos para analizar su efecto.

En el cultivo control de la **Figura 7** se detecta una fase de crecimiento exponencial, seguida de una fase estacionaria y una fase de muerte celular, probablemente debido a que las bacterias han agotado los nutrientes necesarios para crecer.

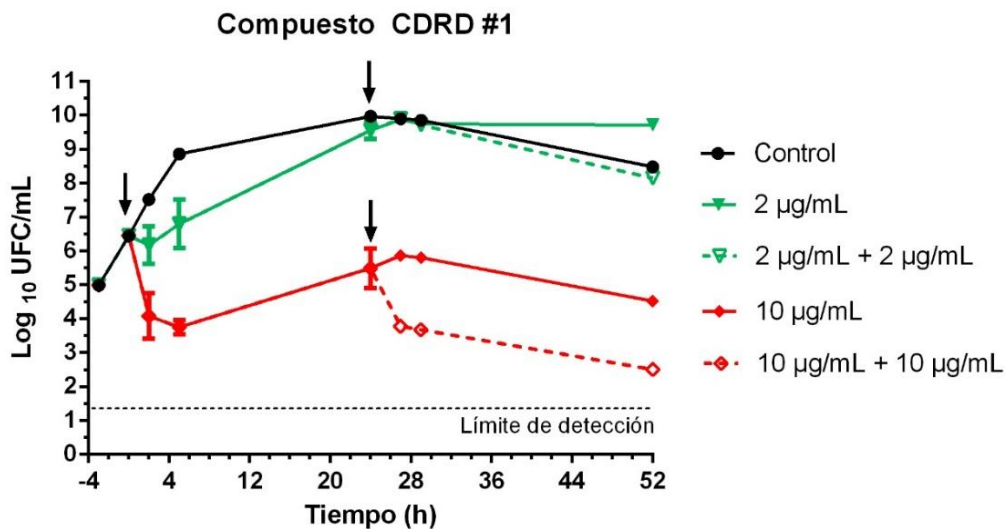


Figura 7. Curva de cinética de muerte en *S. aureus* con adición de compuesto CDRD #1 a 0 y 24 h. Las bacterias se sembraron a 10^5 UFC/mL y se incubaron a 37°C durante 3 h antes de añadir el compuesto CDRD #1 ($t = 0$ h). A las 24 h se volvió a añadir el compuesto a 2 o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a uno de los replicados biológicos (indicado con línea discontinua - - -). Las flechas (\downarrow) indican cuándo se añadió el compuesto ($t = 0$ h y $t = 24$ h). Se realizaron dos replicados biológicos y dos replicados técnicos. Los resultados son la media \pm SD (desviación estándar) de dos replicados biológicos. El límite de detección fue 1,3 \log_{10} UFC/mL. CIM CDRD #1 = 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La adición de una o dos dosis de compuesto CDRD #1 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (valor próximo a la CIM) apenas ejerció efecto sobre el crecimiento bacteriano. Al aumentar la concentración a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se detectó una reducción de 3 \log_{10} UFC/mL a las 5 h. Posteriormente, los cultivos reanudaron el crecimiento -aunque sin alcanzar el nivel de inóculo inicial- indicando que el compuesto #1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presenta actividad bacteriostática frente a cultivos de *S. aureus* en fase exponencial. Esto mismo se observa en la **Figura 6 A**, en la curva de cinética de muerte correspondiente al compuesto #1 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En cambio, la adición de dos dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (a 0 y 24 horas) ejerció un efecto bactericida (reducción de ≥ 3 \log_{10} UFC/mL el nivel de inóculo inicial).

Estos resultados sugieren que los compuestos CDRD apenas ejercen efecto a valores de concentración similares a la CIM. Sin embargo, al superar una cierta concentración crítica, son totalmente eficaces (mecanismo “on/off”).

Además, se realizaron ensayos de cinética de muerte en los que el compuesto #1 se añadió a 2 y 10 µg/mL sobre cultivos en fase estacionaria (10^{10} UFC/mL). No obstante, no se detectaron efectos significativos con respecto al control, indicando que las concentraciones ensayadas no fueron suficientes para inhibir el crecimiento de cultivos con densidades celulares tan elevadas. Mientras que el compuesto 1 a 10 µg/mL sí que fue efectivo frente a cultivos con $10^{6.5}$ UFC/mL (**Figura 7**), apenas mostró actividad en cultivos con 10^{10} UFC/mL, sugiriendo que se requieren mayores concentraciones de compuesto (datos no mostrados).

5.1.2. MYCOBACTERIUM SMEGMATIS MC²155

5.1.2.1. DETERMINACIÓN DE LA CIM POR MICRODILUCIÓN

La actividad antimicrobiana de los compuestos CDRD frente a *M. smegmatis* mc²155 se determinó en medio líquido. Asimismo, se incluyó el antibiótico isoniazida, cuyo valor de CIM para la cepa empleada está bien caracterizada por el grupo.

Tabla 5. CIM de los compuestos CDRD e INH frente a *M. smegmatis*, determinada en medio líquido MH II. Se muestran los resultados de dos replicados técnicos. INH: isoniazida.

Cepa bacteriana	CIM líquido (µg/mL)								
	#1	#2	#3	#4	#6	#7	#8	#9	INH
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	2	2	4	8	4	4	8	2	16

Todos los compuestos CDRD presentaron actividad antibacteriana frente a *M. smegmatis* en el mismo rango de concentraciones que *S. aureus* (2 - 8 µg/mL) (**Tabla 5**). Entre ellos, #1, #2 y #9 mostraron un menor valor de CIM, indicando que podrían ser los compuestos más activos frente a *M. smegmatis*. Cabe señalar que los compuestos #1 y #2 también fueron los más efectivos contra *S. aureus*.

5.1.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CIM EN MEDIO SÓLIDO

Del mismo modo que para *S. aureus*, se seleccionaron los compuestos #1 y #9 para continuar con la caracterización de la actividad de esta nueva serie química.

En la **Tabla 6** se muestran los valores de CIM en medio sólido en función del número de UFC totales (10^3 , 10^5 y 10^7). En todos los casos se obtuvo una CIM de 8 µg/mL (4 veces superior a la CIM en líquido), excepto cuando se sembraron 10^7 UFC totales, observándose un ligero aumento en los valores de CIM.

No obstante, se trata de una variación mínima, por lo que puede asumirse que la actividad de los compuestos #1 y #9 es independiente del número de células sembradas, tal y como se ha descrito para *S. aureus* (**Apartado 5.1.2.2**).

Tabla 6. CIM en sólido de los compuestos CDRD #1 y #9 y de INH, en función del número de UFC totales. Se muestran los resultados de dos replicados técnicos. ND: no determinado.

UFC totales	CIM sólido ($\mu\text{g/mL}$)		
	#1	#9	INH
10^3	8	8	ND
10^5	8	8	16
10^7	>16	16	32

Asimismo, se determinó la CIM en sólido de isoniazida, dato que era necesario conocer de forma previa a los experimentos de aislamiento de mutantes resistentes ya que se empleó dicho antibiótico como control de funcionalidad de la banca de mutantes.

5.1.2.3. ESTUDIOS DE CINÉTICA DE MUERTE

En la **Figura 8 A y B** se muestran las curvas de cinética de muerte obtenidas al añadir los compuestos #1 y #9, respectivamente, a 1, 4 y 10 veces la CIM sin incubación previa de los cultivos (preparados a una densidad de 10^5 UFC/mL directamente a partir de los viales de congelación). Esto se realizó con el objetivo de analizar la actividad de los compuestos sobre células metabólicamente quiescentes.

Tras 1-2 días de incubación, ambos compuestos ejercieron un efecto bactericida y esterilizante a 8 y 20 $\mu\text{g/mL}$. Con respecto a los compuestos #1 y #9 a 2 $\mu\text{g/mL}$, se observó una disminución del crecimiento bacteriano (reducción de 2 y 2,5 \log_{10} UFC/mL, respectivamente, en comparación con el inóculo inicial) durante los dos primeros días, lo cual fue seguido de un aumento exponencial del número de UFCs. Este resultado indica que valores de concentración cercanos a la CIM apenas ejercen efecto sobre los cultivos, como ya se había visto previamente en *S. aureus* (**Figuras 6 y 7**).

En el caso de los cultivos con 2 $\mu\text{g/mL}$ de compuesto (valor de CIM de #1 y #9), se volvió a añadir la misma dosis a los 2 días, observándose un efecto bactericida y esterilizante con el compuesto #9 (**Figura 8 B**). En cambio, con el compuesto #1 únicamente se detectó un efecto bacteriostático, ya que se mantuvo el número de UFCs con respecto al nivel de inóculo inicial (**Figura 8 A**). Estos resultados parecen indicar que el compuesto #9 es más efectivo frente a *M. smegmatis* que el #1.

Se seleccionaron 5 colonias procedentes de los cultivos que habían reanudado su crecimiento tras dos días de incubación en presencia de los compuestos CDRD #1 y #9 para analizar el fenotipo de resistencia mediante determinación de CIM en líquido.

No obstante, todas ellas mostraron los mismos valores de CIM que la cepa silvestre (2 µg/mL), indicando que no eran mutantes resistentes a los compuestos.

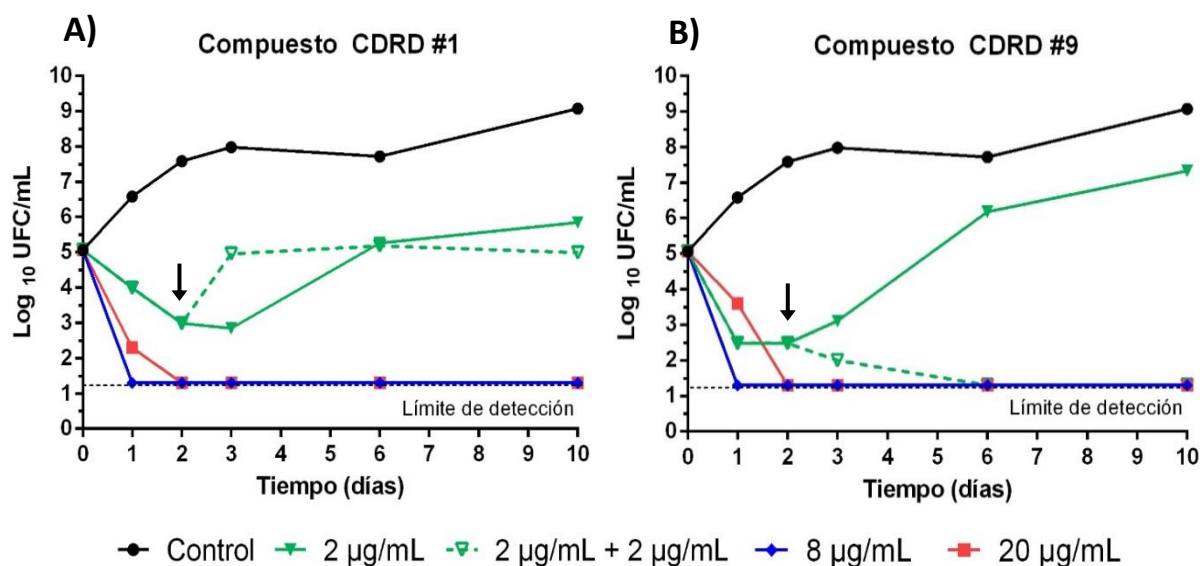


Figura 8. Curva de cinética de muerte en *M. smegmatis*, con adición de compuesto CDRD #1 (A) o CDRD #9 (B). Se prepararon cultivos a una densidad de 10⁵ UFC/mL y se añadieron los compuestos a las concentraciones indicadas sin incubación previa de los cultivos (t = 0 días). La flecha (↓) indica que se volvió a añadir compuesto a los 2 días en los cultivos con 2 µg/mL de compuesto. Línea discontinua (- - -): compuesto añadido a 0 y 2 días. Se muestra la media de dos replicados técnicos. CIM de CDRD #1 y #9 es 2 µg/mL.

En un experimento posterior de cinética de muerte, se prepararon los cultivos a una densidad de 10⁴ UFC/mL y se incubaron a 37 °C durante 24 h antes de añadir los compuestos #1 y #9 (**Figura 9 A y B**, respectivamente) para analizar su actividad frente a cultivos de *M. smegmatis* metabólicamente activos, pero con la misma densidad celular que en el experimento anterior (10⁵ CFU/mL). A los dos días se volvieron a añadir los compuestos a 2 o 10 µg/mL a uno de los replicados biológicos.

Ambos compuestos ejercieron un efecto bactericida y esterilizante a partir del día 3, tras haber añadido dos dosis de 10 µg/mL de compuesto (a 0 y 2 días). Este mismo efecto se alcanzó 6 días después de haber añadido 10 µg/mL de compuesto #9 una sola vez. En cambio, al añadir una dosis de 10 µg/mL de compuesto #1, solamente se detectó un efecto bacteriostático. De nuevo, estos resultados sugieren que el compuesto #9 podría ser más efectivo que el #1 frente a *M. smegmatis*, a pesar de que ambos presenten la misma CIM en líquido (2 µg/mL).

Del mismo modo que en la **Figura 8**, los compuestos #1 y #9 a 2 µg/mL apenas disminuyeron el crecimiento. No obstante, al añadir dos dosis de compuesto #9 a 2 µg/mL se observó un efecto bacteriostático (**Figura 9 B**), mientras que en la cinética de muerte anterior se apreciaba un efecto bactericida (**Figura 8 B**).

Además, ambos compuestos presentaron un efecto bactericida y esterilizante a 8 $\mu\text{g/mL}$, solo un día después de su adición a cultivos preparados con bacterias procedentes de viales de congelación (**Figura 8**). En cambio, este efecto no se detectó al añadir 10 $\mu\text{g/mL}$ de compuesto a cultivos en fase exponencial (**Figura 9**). Por tanto, estos resultados indican que los compuestos son más activos frente a bacterias metabólicamente quiescentes (procedentes de los viales de congelación) que frente a bacterias en fase exponencial y metabólicamente más activas.

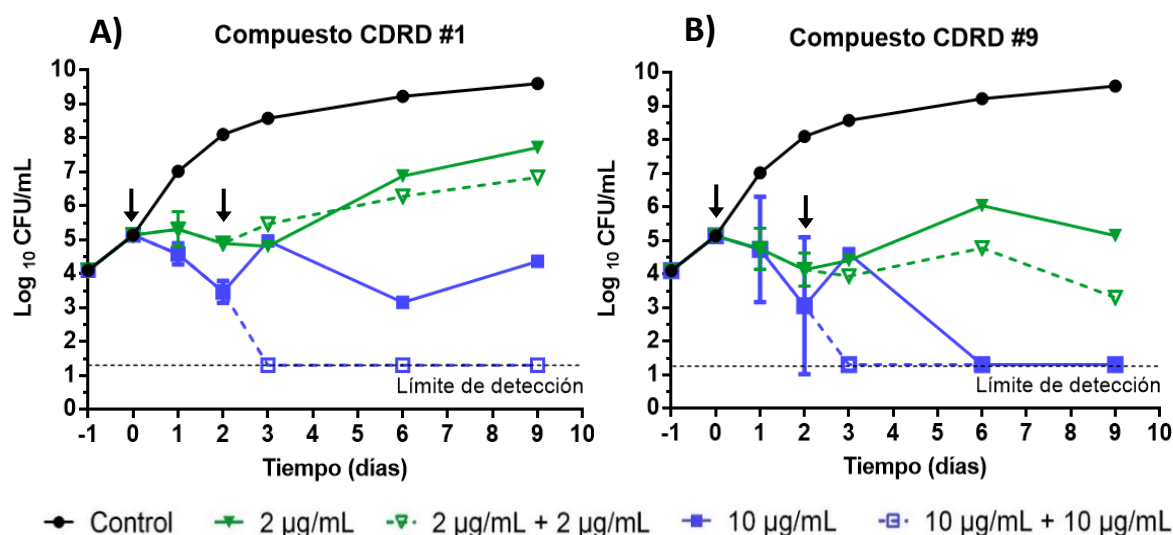


Figura 9. Curva de cinética de muerte en *M. smegmatis*, con adición de compuesto CDRD #1 (A) o CDRD #9 (B). Se prepararon cultivos a una densidad de 10^4 UFC/mL y se cultivaron a 37°C durante 1 día antes de añadir los compuestos #1 o #9 a las concentraciones indicadas ($t = 0$ h). A los dos días se volvió a añadir compuesto a 2 o 10 $\mu\text{g/mL}$ a uno de los replicados biológicos (indicado con línea discontinua - - -). Las flechas (\downarrow) indican los tiempos a los que se añadieron los compuestos ($t = 0$ y $t = 2$ días). Se realizaron dos replicados biológicos y dos replicados técnicos. Se muestra la media \pm SD de dos replicados biológicos. CIM de CDRD #1 y #9 es 2 $\mu\text{g/mL}$.

Asimismo, se evaluó la actividad de los compuestos #1 y #9 frente a cultivos de *M. smegmatis* en fase estacionaria (incubados durante 7 días a 37°C). Puesto que previamente se había obtenido que 2 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de compuesto #1 apenas ejercían efecto frente a cultivos de *S. aureus* en fase estacionaria, se aumentó la concentración a ensayar en estos experimentos (50 y 75 $\mu\text{g/mL}$).

Como resultado, en la **Figura 10 A y B** se observa que los compuestos #1 y #9, respectivamente, presentaron actividad bactericida a 50 y 75 $\mu\text{g/mL}$ frente a cultivos de *M. smegmatis* en fase estacionaria. Es decir, concentraciones 5 y 7,5 veces superiores a las máximas ensayadas en cultivos de *S. aureus* en fase estacionaria (10 $\mu\text{g/mL}$) sí que fueron efectivas.

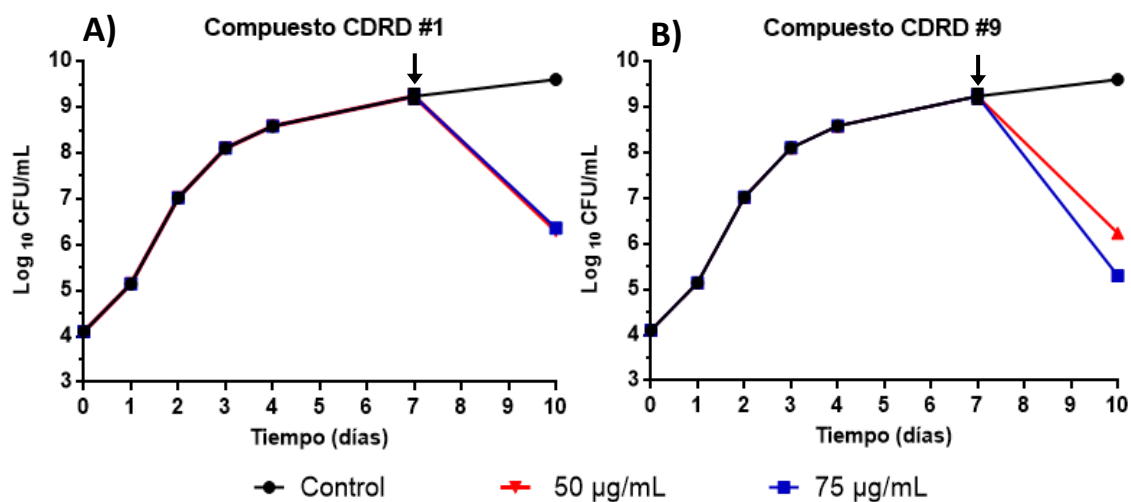


Figura 10. Curva de cinética de muerte en *M. smegmatis*, con adición de compuesto CDRD #1 (A) o CDRD #9 (B). Se prepararon cultivos a una densidad de 10^4 UFC/mL y se cultivaron a 37°C durante 7 días antes de añadir los compuestos #1 o #9 a las concentraciones indicadas. Se realizaron dos replicados biológicos y dos replicados técnicos. Se muestra la media \pm SD de dos replicados biológicos. CIM de CDRD #1 y #9 es $2\ \mu\text{g/mL}$.

Por tanto, se puede concluir que la actividad de los compuestos CDRD depende del estado metabólico de las bacterias, siendo necesarias mayores concentraciones de compuesto para lograr un efecto bactericida en cultivos con elevada densidad celular (10^9 - 10^{10} CFU/mL).

Otro aspecto que debe señalarse es que las curvas de cinética de muerte obtenidas en *M. smegmatis* (Figura 9 A) fueron muy similares a las de *S. aureus* (Figura 7). Los resultados derivados de estos experimentos indican que los compuestos apenas presentan actividad a concentraciones próximas a la CIM. Sin embargo, cuando se supera una cierta concentración crítica, los compuestos pasan de ser inactivos a presentar una gran eficacia (mecanismo “on/off”). Esto es diferente en los compuestos que presentan una actividad dosis-dependiente, donde se observa un rango de actividad en función de la concentración de los compuestos.

5.1.3. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS COMPUESTOS FRENTE A OTROS MICROORGANISMOS

Como se ha descrito en el [Apartado 1.4.2.](#), en las fases *hit to lead* del descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos deben realizarse ensayos de susceptibilidad antimicrobiana frente a otros patógenos relevantes para estudiar el espectro de acción de los compuestos que se desarrollan.

A continuación, se recogen los valores de CIM en medio líquido de los compuestos CDRD frente a diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (**Tabla 7**) y micobacterias (**Tabla 8**), cuyas características más relevantes se han descrito previamente (**Tabla 1**). En el caso de *M. abscessus* y *M. avium*, la CIM se determinó tanto en medio MH II (recomendado para la realización de estos ensayos) como en 7H9 (medio característico para el cultivo de micobacterias) para evaluar si el medio empleado podía influir en la CIM determinada. No obstante, las diferencias detectadas fueron mínimas.

Tabla 7. CIM de los compuestos CDRD frente a las bacterias indicadas, determinada en medio líquido MH II. Se muestra la media de dos replicados técnicos. ND: no determinada.

Cepa bacteriana	CIM líquido (µg/mL)							
	#1	#2	#3	#4	#6	#7	#8	#9
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	2	1	2	2	2	4	4	4
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	2	1	2	1	2	2	2	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	>8	4	8	8	8	8	>8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>64	>64	ND	ND	ND	ND	ND	>64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>64	>64	ND	ND	ND	ND	ND	>64
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	2	4	2	8	>8	8	8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	8	4	4	4	4	8	4	>8

Tabla 8. CIM de los compuestos frente a diversas micobacterias, determinada en medio líquido. Se indica el medio empleado en cada caso (MH II y/o 7H9). Los resultados son la media de dos replicados técnicos. Los valores de CIM para *M. tuberculosis* se obtuvieron en colaboración con la Dra. Ainhoa Lucía. ND: no determinado.

Cepa bacteriana	Medio	CIM líquido (µg/mL)							
		#1	#2	#3	#4	#6	#7	#8	#9
<i>Mycobacterium abscessus</i>	MH II	8-16	8-16	>16	16	16	8	ND	16
	7H9	8-16	16	16	>16	16	8	8	16
<i>Mycobacterium avium</i>	MH II	8	8-16	8-16	16	8-16	8	ND	8
	7H9	8	4-8	8	>16	16	8	8	8
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	MH II	2	2	4	8	4	4	8	2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7H9	2	2-4	2	16	2	2-4	2-4	2-4

Estos compuestos fueron activos contra un amplio espectro de bacterias, con valores de CIM en el rango de 2 - 8 µg/mL en el caso de Gram-positivas y 2 - 16 µg/mL para las micobacterias. Este aspecto resulta de gran interés, ya que la mayor parte de los agentes antimicrobianos que se encuentran en ensayos clínicos hoy en día son efectivos frente a un número limitado de patógenos, mientras que la OMS advierte de la necesidad de nuevos compuestos que sean activos contra más de una bacteria de las incluidas en la lista de patógenos prioritarios de la OMS (5).

Además, se evaluó la actividad de los compuestos #1, #2 y #9 frente a las bacterias Gram-negativas *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, obteniéndose como resultado que los compuestos no fueron activos frente a dichas bacterias en el rango de concentraciones ensayadas (CIM > 64 µg/mL, máxima concentración utilizada). Esto podría deberse a los mecanismos de resistencia intrínsecos de las bacterias Gram-negativas, como los sistemas de eflujo con amplio espectro de drogas en la membrana interna o la baja permeabilidad de la membrana externa (3).

5.1.4. ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS EN COMBINACIÓN CON INHIBIDORES DE BOMBAS DE EFLUJO (EPIs)

5.1.4.1. EFECTO FRENTE A *S. AUREUS* Y *M. SMEGMATIS*

Como se ha descrito en el **Apartado 1.3.2**, las bombas de eflujo constituyen sistemas de transporte activo al medio extracelular de gran variedad de compuestos y, por lo general, están asociadas a una mayor resistencia a antimicrobianos. Una manera de favorecer la posible selección de mutantes resistentes a los compuestos se basa en desarticular los mecanismos intrínsecos de resistencia mediante el empleo EPIs, los cuales favorecen la acumulación intracelular del compuesto. Al mismo tiempo, pueden evitar la aparición de mutantes resistentes debido a la sobreexpresión de bombas de eflujo.

Por ello, se evaluó la actividad de los compuestos #1 y #2 (muy activos frente a *S. aureus* y *M. smegmatis*) y del #8 (con menor actividad frente a estas bacterias) en presencia de PAβN, CCCP, REP o VER (compuestos descritos con actividad EPI) mediante CIM en líquido. Esto se hizo para valorar si la combinación de diversos EPIs con compuestos CDRD de actividad variada podría ser una estrategia factible para el aislamiento de los mutantes resistentes.

Previamente, se determinó la CIM de los EPIs empleados frente a *S. aureus* y *M. smegmatis* (véase **ANEXO II**) para seleccionar las concentraciones sub-inhedoras de los EPIs que se iban a utilizar en los experimentos. Esto es importante ya que, en caso de haberse utilizado concentraciones inhibitorias, se habría sobreestimado la actividad de los compuestos.

Como se muestra en la **Tabla 9**, en el caso de *S. aureus* se obtuvieron ligeras disminuciones en los valores de CIM de los compuestos CDRD (reducción de dos o cuatro veces la CIM) cuando éstos se combinaron con PAβN a 2 y 4 µg/mL ($1/16 \times \text{CIM}_{\text{PA}\beta\text{N}}$ y $1/8 \times \text{CIM}_{\text{PA}\beta\text{N}}$, respectivamente) o con reserpina a 16 y 32 µg/mL ($1/128 \times \text{CIM}_{\text{REP}}$ y $1/64 \times \text{CIM}_{\text{REP}}$, respectivamente).

Esta disminución de los valores de CIM en presencia de concentraciones subinhibitorias de reserpina podría explicarse por la acción inhibitoria que ejerce dicho EPI sobre la bomba de eflujo MDR NorA de *S. aureus*, perteneciente a la familia de transportadores MFS (del inglés, *Major Facilitator Superfamily*), la cual se ha descrito que confiere resistencia frente a fluoroquinolonas. De hecho, la reserpina se emplea a menudo para determinar si la resistencia está causada por sistemas de bombas de eflujo MDR en bacterias Gram-positivas (48).

Tabla 9. CIM ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos CDRD #1, #2 y #8 frente a *S. aureus* en ausencia o presencia de PA β N, CCCP, REP y VER a las concentraciones indicadas ($\mu\text{g/mL}$). Se indican en **negrita** los valores de CIM inferiores al del compuesto correspondiente en ausencia de EPI. Se muestran los resultados de dos replicados técnicos.

Compuestos CDRD	Sin EPI	PA β N ($\mu\text{g/mL}$)		CCCP ($\mu\text{g/mL}$)		REP ($\mu\text{g/mL}$)		VER ($\mu\text{g/mL}$)	
		2	4	0,125	0,25	16	32	4	8
		#1	2	1	1	2	2	0,5-1	0,5
#2	2	2	1	2	2	1-2	1	2	2
#8	4	2	2	4	4	4	4	2	2-4

Con respecto a *M. smegmatis*, los valores de CIM de los compuestos CDRD (indicados en la **Tabla 5**) no variaron en presencia de ninguno de los EPIs a las concentraciones ensayadas (PA β N, 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$; CCCP, 0,25 y 0,5 $\mu\text{g/mL}$; REP, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$; VER, 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$). Estos resultados podrían indicar que los compuestos CDRD no son sustrato de las bombas de eflujo inhibidas por la acción de los EPIs empleados.

En definitiva, dado que en presencia de los EPIs no se detectaron variaciones en los valores de CIM de los compuestos (*M. smegmatis*) o éstas fueron mínimas (*S. aureus*), los experimentos de aislamiento de mutantes resistentes a los compuestos se realizaron en ausencia de EPIs (véase **Apartado 5.2**).

5.1.4.2. EFECTO FRENTE A BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana realizados previamente indicaron que los compuestos no son activos frente a bacterias Gram-negativas (CIM > 64 $\mu\text{g/mL}$).

Para estudiar si los sistemas de bombas de eflujo podían estar implicados en esa resistencia, se evaluó la CIM de los compuestos CDRD #1, #2 y #9 en presencia de concentraciones subinhibitorias de ciertos EPIs (PA β N, CCCP, REP y VER). Se escogieron los compuestos #1 y #9 por disponerse una mayor cantidad de los mismos -como se ha descrito previamente-, y por ser de los compuestos más activos frente a micobacterias y Gram-positivas junto al compuesto #2.

Previamente fue necesario determinar la CIM de cada EPI frente a *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* (véase **ANEXO II**), como se ha descrito en el **apartado 5.1.4.1**.

En las **Tablas 10 y 11** se observa que las CIM de los compuestos CDRD #1, #2 y #9 frente a *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* se redujeron en presencia de 32 µg/mL de PAβN ($1/8 \times \text{CIM}_{\text{PA}\beta\text{N}}$), mientras que el resto de EPIs a las concentraciones ensayadas no tuvieron ningún efecto sobre la actividad de los compuestos. Puesto que se emplearon concentraciones subinhibitorias de PAβN, se puede confirmar que los compuestos CDRD fueron los responsables de la actividad antibacteriana observada.

Entre los compuestos ensayados, el #2 (en combinación con 32 µg/mL de PAβN) pareció ser el más activo tanto en *P. aeruginosa* como en *K. pneumoniae* -compuesto que también resultó ser uno de los más efectivos frente a otros microorganismos-.

Tabla 10. CIM de los compuestos CDRD #1, #2 y #9 frente a *P. aeruginosa*, en ausencia o presencia de PAβN, CCCP o REP a las concentraciones indicadas. Los resultados son la media de dos replicados técnicos.

Compuestos CDRD	CIM (µg/mL)			
	Sin EPI	PAβN 32 µg/mL	CCCP 4 µg/mL	REP 32 µg/mL
#1	>64	8	>64	>64
#2	>64	4	>64	>64
#9	>64	16	>64	>64

Tabla 11. CIM de los compuestos CDRD #1, #2 y #9 frente a *K. pneumoniae*, en ausencia o presencia de PAβN, CCCP, REP o VER a las concentraciones indicadas. Los resultados son la media de dos replicados técnicos.

Compuestos CDRD	CIM (µg/mL)				
	Sin EPI	PAβN 32 µg/mL	CCCP 0,25 µg/mL	REP 32 µg/mL	VER 32 µg/mL
#1	>64	32	>64	>64	>64
#2	>64	8-16	>64	>64	>64
#9	>64	32	>64	>64	>64

Los resultados obtenidos podrían indicar que las bombas de eflujo inhibidas por acción de PAβN ejercen un papel importante en la expulsión de los compuestos CDRD del interior celular, favoreciendo que las bacterias Gram-negativas sean resistentes a los compuestos. Al tratar las bacterias con los compuestos CDRD en presencia de PAβN, dicho EPI estaría favoreciendo la acumulación de los compuestos en el interior celular y, por tanto, reduciendo la resistencia a los mismos.

Dado que PA β N es uno de los inhibidores más estudiados de los transportadores RND de *P. aeruginosa*, capaz de disminuir la resistencia intrínseca a determinados antibióticos (p. ej. levofloxacina), y que esta familia de transportadores está implicada en la resistencia a agentes antimicrobianos en las bacterias Gram-negativas (*P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*), los resultados obtenidos sugieren que la resistencia a los compuestos CDRD podría darse por sistemas de bombas de eflujo RND (29), (48).

En definitiva, estos resultados reflejan el papel de los EPIs como herramienta útil para obtener información acerca de los mecanismos de resistencia de las bacterias. Asimismo, los EPIs se plantean como una posible alternativa para potenciar la actividad de determinados agentes antimicrobianos sujetos a mecanismos de eflujo (48).

5.1.5. ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS EN COMBINACIÓN CON BEDAQUILINA FRENTE A *M. AVIUM* Y *M. ABSCESSUS*

Teniendo en cuenta la potente actividad antimicrobiana de los compuestos CDRD frente a micobacterias (**Tabla 8**), se planteó como objetivo evaluar la actividad de los mismos en combinación con bedaquilina mediante ensayos de *checkerboard* (véase **Apartado 4.4.2**). La bedaquilina, agente antimicrobiano aprobado en 2012 para el tratamiento de MDR-TB, es bastante tóxica, en concreto cardiotóxica (con incrementos del intervalo QT). Por ello, resulta de gran interés estudiar posibles combinaciones sinérgicas para reducir su dosis y por tanto, su toxicidad (31).

En estos experimentos se empleó el compuesto CDRD #6 ya que, al tratarse de uno de los menos activos frente a *M. abscessus* y *M. avium*, se esperaba que la posible reducción del valor de CIM en presencia de bedaquilina pudiera ser mayor que en el caso de compuestos muy activos por sí solos (como el #7). Otro motivo fue que apenas se detectaron diferencias en la actividad del compuesto #6 en función del medio empleado (**Tabla 8**).

En la **Figura 11 A y B** se muestra el perfil de interacción de bedaquilina y CDRD #6 en *M. abscessus* y *M. avium*, respectivamente, en función del medio empleado. En todos los casos, las curvas obtenidas en los isobogramas se aproximan a los ejes, indicando que hay sinergia entre el compuesto #6 y bedaquilina. Esto mismo se confirmó al determinar el índice FICI como se describe en el **Apartado 4.4.2**, pues se obtuvieron valores $FICI \leq 0,5$. En cada perfil de interacción, el punto de la curva más cercano a la intersección de los ejes constituye la combinación más efectiva para inhibir el crecimiento bacteriano.

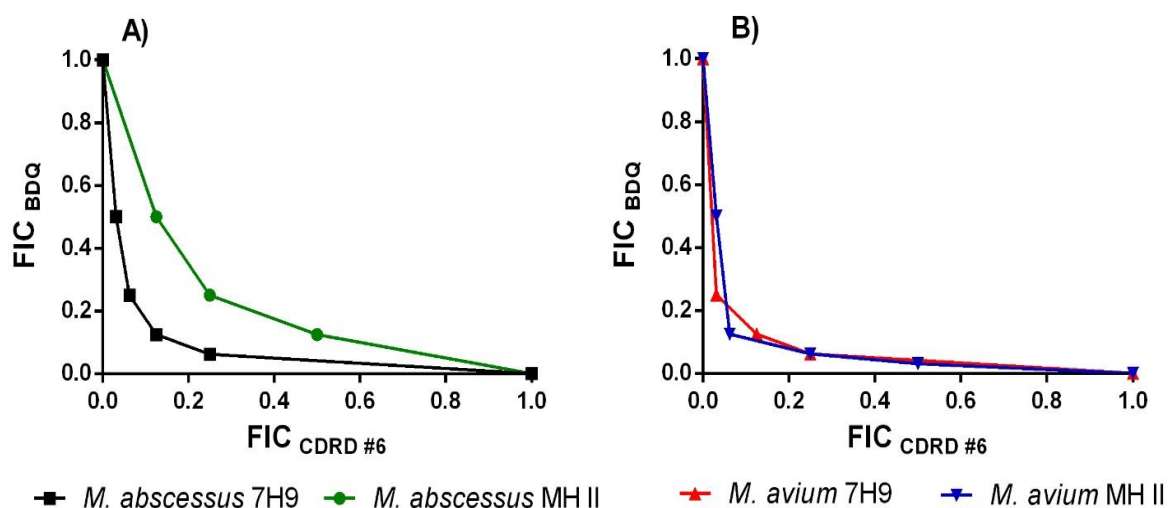


Figura 11. Valores FIC de bedaquilina (BDQ) frente a los valores FIC de CDRD #6, para *M. abscessus* (A) y *M. avium* (B) en función del medio (7H9 o MH II).

Las concentraciones más efectivas de estas combinaciones sinérgicas que inhiben el crecimiento bacteriano quedan recogidas en la **Tabla 12**. En todos los casos, los valores de CIM de cada compuesto en la combinación (CIMsyn BDQ y CIMsyn #6) fueron inferiores en un factor entre 4 y 16 veces a los de los agentes antimicrobianos empleados por separado (CIM BDQ y CIM #6).

Tabla 12. Ensayo de *checkerboard* del compuesto CDRD #6 en combinación con BDQ frente a *M. abscessus* y *M. avium* en medio 7H9 y MH II. Se indican las combinaciones sinérgicas más efectivas para cada cepa bacteriana y medio empleado (CIMsyn BDQ: CIM sinérgica de BDQ en presencia de CDRD #6; CIMsyn CDRD #6: CIM sinérgica de CDRD #6 en presencia de BDQ), y los valores de CIM de BDQ y #6 por separado. FICI se calculó como se describe en el *Apartado 4.4.2*. FICI $\leq 0,5$ indica sinergismo.

Cepa bacteriana	Medio	CIM BDQ ($\mu\text{g/mL}$)	CIM #6 ($\mu\text{g/mL}$)	CIMsyn BDQ ($\mu\text{g/mL}$)	CIMsyn #6 ($\mu\text{g/mL}$)	FICI	Interacción
<i>M. abscessus</i>	7H9	0,05	8	0,006	1	0,25	Sinergismo
	MH II	0,02	4	0,005	1	0,5	Sinergismo
<i>M. avium</i>	7H9	0,2	8	0,025	1	0,25	Sinergismo
	MH II	0,08	8	0,010	0,5	0,188	Sinergismo

En *M. abscessus*, las concentraciones más efectivas de las combinaciones sinérgicas apenas variaron en función del medio empleado. En el caso de *M. avium*, la combinación fue ligeramente más efectiva en medio MH II (valores de CIM inferiores). No obstante, estas diferencias fueron mínimas (véase **Tabla 12**).

En definitiva, los resultados preliminares obtenidos en estos ensayos indican que los compuestos CDRD podrían permitir dosis más bajas de bedaquilina durante los tratamientos y, de este modo, reducir su toxicidad. No obstante, se necesitan más estudios para analizar los efectos sinérgicos entre los compuestos CDRD y la bedaquilina.

5.2. AISLAMIENTO DE MUTANTES RESISTENTES A LOS COMPUESTOS

Una vez caracterizada la actividad de los compuestos frente a *S. aureus* y *M. smegmatis* (entre otras bacterias), se pudieron establecer las condiciones más apropiadas para la selección de mutantes resistentes a los compuestos. Esta búsqueda inicial del modo de acción molecular de los compuestos CDRD se realizó en *S. aureus* y *M. smegmatis*, como se describe a continuación.

5.2.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS MSSA

Los ensayos de selección de mutantes en *S. aureus* se realizaron con el compuesto CDRD #1, pues los experimentos previos de determinación de CIM en sólido indicaron que podría ser más activo que CDRD #9 frente a *S. aureus*. Además, estos ensayos demostraron que la actividad de los compuestos #1 y #9 era independiente del número de células sembradas, por lo que se tuvo como referencia un valor de CIM de 4 µg/mL en todas las densidades celulares ensayadas (véase **Tabla 4**).

5.2.1.1. PLACAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COMPUESTO

Como primera aproximación a la selección de mutantes resistentes en *S. aureus*, se sembraron diversas densidades celulares (en torno a 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 UFCs) en placas con medio agar MH II suplementado con el compuesto #1 a 16 y 40 µg/mL (4 y 10 veces la CIM_{CDRD#1} determinada en sólido, respectivamente).

Tras una semana de incubación a 37 °C, no se detectaron colonias de mutantes resistentes en ninguna de las condiciones ensayadas, excepto en las placas control (sin compuesto CDRD #1) -donde sí se observó crecimiento- (véase **Figura 12**).

Como control interno de la estrategia se utilizó rifampicina en las mismas condiciones que el compuesto #1. Es decir, se sembraron 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC totales en placas con agar MH II suplementado con rifampicina a 4xCIM_{RIF} (0,032 µg/mL) y 10xCIM_{RIF} (0,080 µg/mL). En este caso, se tuvo como referencia un valor de CIM en sólido de 0,008 µg/mL para todas las densidades celulares ensayadas (véase **Tabla 4**), ya que el ligero crecimiento detectado en presencia de concentraciones superiores a 0,008 µg/mL al sembrar 10^5 y 10^7 UFC totales (descrito en **Apartado 5.1.1.2**), podía deberse precisamente a la selección de mutantes resistentes.

Como resultado, se observaron colonias en las placas suplementadas con 4xCIM_{RIF} y 10xCIM_{RIF} en las que se habían sembrado 10⁶, 10⁷ y 10⁸ UFCs. El fenotipo de resistencia a rifampicina se validó mediante determinación de CIM en líquido de 5 colonias seleccionadas al azar (cuya CIM fue > 0,5 µg/mL), utilizando como control la cepa silvestre (CIM = 0,0039 µg/mL). Este resultado demostró la funcionalidad de la técnica empleada.

Los resultados obtenidos permitieron determinar una frecuencia de aparición de mutantes resistentes a rifampicina de, aproximadamente, 3,3·10⁻⁶ y 1,7·10⁻⁶ en las placas suplementadas con 0,032 µg/mL y 0,080 µg/mL, respectivamente. Estos resultados fueron similares a los descritos en un estudio en el que se evaluó la tasa de mutación de 60 aislados MSSA frente a rifampicina, donde se obtuvieron valores entre 10⁻⁶ y 10⁻⁸ (49).

En el caso del compuesto CDRD #1, puesto que no se seleccionaron colonias resistentes en las condiciones ensayadas, se estima que la tasa de mutación es baja (< 1·10⁻⁸), lo cual es interesante para su posible uso como agente antimicrobiano.

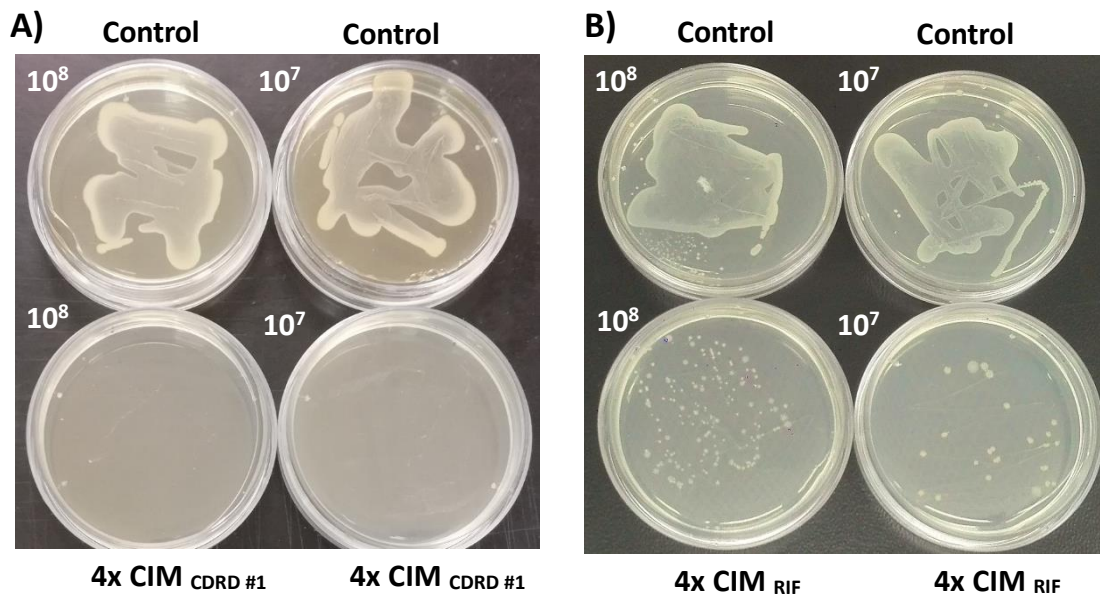


Figura 12. Placas de selección de mutantes resistentes al compuesto CDRD #1 (A) o a RIF (B) en *S. aureus*. Se indica el número de UFCs/placa (10⁸ o 10⁷), y si se suplementaron con agente antimicrobiano (4xCIM) o no (control). CIM_{CDRD#1} = 4 µg/mL; CIM_{RIF}=0,008 µg/mL.

5.2.1.2. PLACAS CON GRADIENTE DE CONCENTRACIÓN DEL COMPUESTO

En la aproximación anterior se ensayaron dos valores fijos de concentración (4xCIM y 10xCIM), por lo que puede que no se estuviesen detectando mutantes resistentes crecidos a concentraciones intermedias.

Por ello, para hacer la selección en un rango completo de concentraciones, se prepararon placas con gradiente de concentración del compuesto #1 (de 0 a 10xCIM). En este caso, se sembró una elevada densidad celular (10^8 UFC totales) dado que en los experimentos previos se había detectado que la tasa de mutación era baja.

Mediante esta aproximación, los mutantes resistentes deberían encontrarse en la intersección entre la zona de crecimiento y la zona de inhibición del agente antimicrobiano. En la **Figura 13** se pueden distinguir ambas zonas con claridad; sin embargo, no se detectan colonias en la zona de intersección. Este resultado refleja la potente actividad del compuesto CDRD #1 a partir de una cierta concentración crítica, pasando de ser inactivo a presentar una alta eficacia, lo que concuerda con las curvas de cinética de muerte obtenidas previamente (**Apartados 5.1.1** y **5.1.2**).

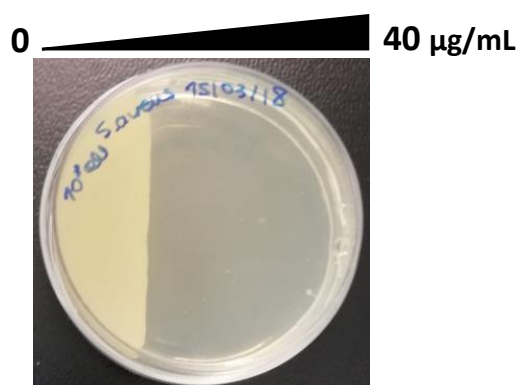


Figura 13. Placas de selección de mutantes resistentes con gradiente de concentración del compuesto CDRD #1 (0 a 10xCIM). Se sembraron 10^8 UFC totales. CIM_{CDRD#1} = 4 µg/mL.

5.2.2. MYCOBACTERIUM SMEGMATIS

5.2.2.1. BANCA DE MUTANTES POR TRANSPOSICIÓN

Otra de las estrategias empleadas para la selección de mutantes resistentes a los compuestos se basó en el empleo de una banca de mutantes por transposición en *M. smegmatis* HS42 disponible en el GGM. Con esta aproximación se esperaba aumentar la probabilidad de seleccionar mutantes resistentes, para posteriormente detectar los genes que tienen el potencial de conferir resistencia a los compuestos.

A partir de los resultados de CIM en sólido obtenidos, se pudo asumir que la actividad del compuesto #9 era independiente de la densidad celular (**Tabla 6**). Por ello, en todos los casos se sembraron aproximadamente 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC totales de la banca en placas con agar MH II suplementado con el compuesto #9 a 20 y 50 µg/mL.

Se escogió el compuesto #9 ya que los resultados obtenidos durante la caracterización previa indicaron que era más activo frente a *M. smegmatis* que el #1, lo que podría favorecer la selección de mutantes.

Tras incubar las placas durante tres semanas, no se detectaron colonias de mutantes resistentes al compuesto #9 en ninguna de las condiciones ensayadas, reflejando de nuevo la dificultad para aislar mutantes resistentes a dichos compuestos.

Como control de la funcionalidad de la banca se empleó isoniazida, pues la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a dicho antibiótico está caracterizada (46). Teniendo en cuenta los valores de CIM en sólido determinados previamente, se prepararon placas con agar MH II suplementado con isoniazida a 16, 64 y 160 µg/mL (1x, 4x y 10 veces la CIM obtenida en sólido con 10⁵ UFC totales) y se sembraron aproximadamente 10⁵, 10⁶, 10⁷ y 10⁸ UFC totales de la banca.

En este caso, sí que se detectaron colonias de mutantes resistentes a isoniazida en las placas de 16 µg/mL con 10⁷ y 10⁸ UFC, así como en la placa de 64 µg/mL con 10⁸ UFC. Se seleccionaron 5 colonias para validar el fenotipo de resistencia a isoniazida mediante determinación de CIM en líquido; en todos los casos se obtuvieron valores de CIM superiores a 128 µg/mL, mientras que la cepa silvestre tuvo una CIM de 32 µg/mL.

Por tanto, estos resultados reflejaron la funcionalidad de la banca como herramienta para la selección de mutantes resistentes a agentes antimicrobianos, tal y como se había verificado previamente (46). No obstante, no ha sido posible la selección de mutantes resistentes a los compuestos CDRD en las condiciones ensayadas.

Además de las aproximaciones descritas en el presente **Apartado 5.2**, también se trató de seleccionar mutantes (en *S. aureus* y *M. smegmatis*) mediante curvas de cinética de muerte con adición de compuesto a diferentes tiempos, incluidas en los **Apartados 5.1.1.3** y **5.1.2.3**. En estos experimentos se volvió a añadir compuesto a aquellos cultivos que habían reanudado su crecimiento tras un periodo de muerte inicial para analizar si continuaba aumentando el número de bacterias debido a la generación de mutantes resistentes a los compuestos. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, la posterior adición de compuesto provocó una disminución del crecimiento bacteriano, indicando que la población de bacterias era sensible a los compuestos (**Figura 7**). En aquellos cultivos en los que la adición posterior de compuesto no afectó al crecimiento, se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana de colonias seleccionadas al azar para verificar el fenotipo de resistencia (**Figura 8A**). No obstante, en todos los casos se obtuvieron los mismos valores de CIM que la cepa silvestre, indicando que no se habían seleccionado colonias resistentes a los compuestos.

6. DISCUSIÓN GENERAL

El presente Trabajo Fin de Máster ha tenido como principales objetivos estudiar la actividad antimicrobiana de una nueva serie química de compuestos frente a diversas bacterias y establecer las bases para identificar el mecanismo de acción molecular de los compuestos, aspectos que deben conocerse en las fases *hit to lead* del proceso de desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

Los compuestos CDRD utilizados en este trabajo presentaron actividad antimicrobiana frente a diversas bacterias Gram-positivas (*S. aureus*, *E. faecalis*, *C. diphtheriae*...) y micobacterias (*M. abscessus*, *M. avium*, *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*), indicando que son efectivos frente a un amplio número de patógenos humanos.

Sin embargo, estos compuestos no fueron activos (CIM > 64 µg/mL) frente a las bacterias Gram-negativas utilizadas (*P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*), lo cual podría deberse a los sistemas de bombas de eflujo de la familia RND. Una manera de evaluar la posible implicación de dichos transportadores en la resistencia de las bacterias Gram-negativas a los compuestos, consiste en analizar el perfil de susceptibilidad antimicrobiano a los compuestos en mutantes de delección y de sobreexpresión de esta familia de bombas de eflujo (50), aproximación que espera llevarse a cabo en futuros experimentos.

De forma complementaria, mediante ensayos de *checkerboard* se observó un efecto sinérgico entre el compuesto CDRD #6 y bedaquilina frente a *M. avium* y *M. abscessus*. Estos resultados tienen un gran interés, ya que su uso en combinación podría reducir la dosis de bedaquilina durante los tratamientos, disminuyendo por tanto su toxicidad.

En cuanto al modo de acción de los compuestos, tanto los experimentos de cinética de muerte como los ensayos con placas en gradiente para la selección de mutantes resistentes, han demostrado que los compuestos CDRD presentan una actividad muy potente (bactericida) a partir de una cierta concentración crítica (mecanismo "on/off"), pasando de ser inactivos (en valores próximos a la CIM) a presentar una alta efectividad. Además, se ha visto que la actividad de los compuestos varía en función del estado metabólico de las bacterias (metabólicamente quiescentes, fase exponencial o fase estacionaria).

Previamente a la selección de mutantes resistentes en medio sólido, se determinó que la actividad de los compuestos #1 y #9 era independiente del número de bacterias sembradas (10^3 , 10^5 y 10^7 UFC), tanto en *S. aureus* como en *M. smegmatis*.

Este aspecto debe estudiarse antes de realizar los experimentos de aislamiento de mutantes, ya que en ciertas ocasiones los valores de CIM en sólido no se corresponden con los determinados en medio líquido, o varían en función del número de células sembradas (42).

En este trabajo se emplearon diversas estrategias para el aislamiento de mutantes resistentes: selección en medio sólido (placas con valores fijos o con gradiente de concentración del compuesto), curvas de cinética de muerte con adición de compuesto a diferentes tiempos y banca de mutantes por transposición en *M. smegmatis* HS42.

Puesto que no se ha logrado seleccionar mutantes resistentes mediante ninguna de las aproximaciones empleadas, no ha sido posible la elucidación del modo de acción molecular. A pesar de ello, se ha estimado que la frecuencia de mutación de estos compuestos es baja (inferior a 10^{-8}), lo cual es un aspecto prometedor ya que la aparición de resistencia espontánea a los compuestos es un indicador de la poca viabilidad como tratamiento antimicrobiano, al menos en monoterapia.

Una posible explicación al hecho de que no se hayan podido seleccionar mutantes resistentes es que la propia mutación que confiere resistencia sea letal por afectar a procesos celulares esenciales.

Asimismo, otro motivo podría estar relacionado con lo que se conoce como “*fitness*” de la bacteria, definido como la capacidad de la bacteria para adaptar su metabolismo y multiplicarse. En caso de que las bacterias mutantes resistentes a los compuestos tengan un *fitness* inferior al de la cepa silvestre, la población bacteriana resistente podría eliminarse durante el crecimiento antes de la selección, reduciendo con ello la posibilidad de selección de mutantes (51).

Aunque no se dispone información relativa al mecanismo de acción molecular de los compuestos, éste debería implicar diana(s) conservadas, pues se ha demostrado que la actividad de estos compuestos se mantiene frente a un amplio espectro de bacterias.

En base a los resultados obtenidos, en futuros experimentos se emplearán otras aproximaciones para elucidar el mecanismo de acción molecular de los compuestos. A modo de ejemplo, se espera utilizar una banca de mutantes por transposición en *S. aureus*, en la que cada uno de ellos se mantiene de manera individual, lo que permite identificar mutantes susceptibles a los compuestos (en lugar de mutantes resistentes, como se ha intentado durante este trabajo).

Otra posible alternativa consiste en realizar pases diarios de cultivos de *S. aureus* en medio líquido con concentraciones subinhibitorias crecientes de los compuestos, lo cual induce un estrés celular que podría favorecer la selección de mutantes resistentes (52).

Por último, las técnicas ómicas (transcriptómica, proteómica) también podrían ser muy útiles para obtener información acerca del mecanismo de acción molecular de los compuestos (53).

En resumen, estos compuestos presentan propiedades prometedoras para su posible progresión a ensayos preclínicos, de tal manera que es necesario realizar más estudios para identificar el modo molecular de acción antimicrobiana de los mismos.

7. CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- 1- Los compuestos CDRD presentan actividad antimicrobiana frente a diversas bacterias Gram-positivas y micobacterias (valores de CIM entre 2 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- 2- La resistencia de las bacterias Gram-negativas a los compuestos CDRD (CIM > 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) podría estar mediada por bombas de eflujo de la familia RND, ya que los valores de CIM se redujeron a 4 - 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en presencia de PA β N.
- 3- La combinación del compuesto CDRD #6 con bedaquilina presenta un efecto sinérgico (FICI \leq 0,5) en *M. avium* y *M. abscessus*.
- 4- Las cinéticas de muerte realizadas en *S. aureus* y *M. smegmatis* indican que los compuestos CDRD presentan una actividad muy potente a partir de una cierta concentración crítica (mecanismo "on/off"). Esta actividad depende del estado metabólico de las bacterias.
- 5- La actividad de los compuestos #1 y #9 es independiente del número de UFCs sembradas (10^3 , 10^5 y 10^7 UFCs), tanto en *S. aureus* como en *M. smegmatis*.
- 6- La frecuencia de aparición de mutantes resistentes a los compuestos es baja ($<10^{-8}$), lo cual es un aspecto prometedor para su potencial uso como tratamiento antimicrobiano.

CONCLUSIONS

Once the results obtained in this work have been analysed, we could conclude the following:

- 1- CDRD compounds show antimicrobial activity against various Gram-positive bacteria and mycobacteria (MIC values in the range of 2-16 $\mu\text{g/mL}$).
- 2- Efflux pumps of RND family could be involved in the resistance of Gram-negative bacteria to CDRD compounds (MIC > 64 $\mu\text{g/mL}$), since MIC values were reduced to 4-32 $\mu\text{g/mL}$ in presence of PA β N.
- 3- The combination of CDRD compound #6 with bedaquiline showed a synergic effect (FICI \leq 0,5) in *M. avium* and *M. abscessus*.
- 4- Kill kinetic assays revealed that CDRD compounds have strong bactericidal activity above a critical concentration in *S. aureus* and *M. smegmatis* ("on/off" mechanism). This activity depends on the metabolic state of the bacteria.
- 5- Activity of compound #1 and #9 is independent of the number of CFU plated (10^3 , 10^5 and 10^7 CFU), both in *S. aureus* and *M. smegmatis*.
- 6- Frequency of mutation to CDRD compounds is low ($<10^{-8}$), so they could be promising new antimicrobial agents.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*. 2016 Jan 21;529(7586):336–43.
2. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 May;12(5):371–87.
3. Jackson N, Czaplewski L, Piddock LJV. Discovery and development of new antibacterial drugs: learning from experience? *J Antimicrob Chemother*. 2018 Jun 1;73(6):1452–9.
4. Fernandes P. Antibacterial discovery and development--the failure of success? *Nat Biotechnol*. 2006 Dec;24(12):1497–503.
5. WHO | ANTIBACTERIAL AGENTS IN CLINICAL DEVELOPMENT, 2017.
6. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharm Ther*. 2015 Apr;40(4):277–83.
7. Almeida Da Silva PEA, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jul;66(7):1417–30.
8. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Res Int*. 2016;2016:1–8.
9. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Registro hospitalario de pacientes afectados por las resistencias bacterianas. 2018.
10. WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017.
11. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*. 2003 May 1;111(9):1265–73.
12. Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 12(s1):16–23.
13. WHO. Global Tuberculosis Report 2017.
14. Nahid P, Dorman SE, Alipanah N, Barry PM, Brozek JL, Cattamanchi A, et al. Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2016 Oct 1;63(7):e147–95.
15. Nguyen TVA, Anthony RM, Bañuls A-L, Nguyen TVA, Vu DH, Alffenaar J-WC. Bedaquiline Resistance: Its Emergence, Mechanism, and Prevention. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2018 May 2;66(10):1625–30.

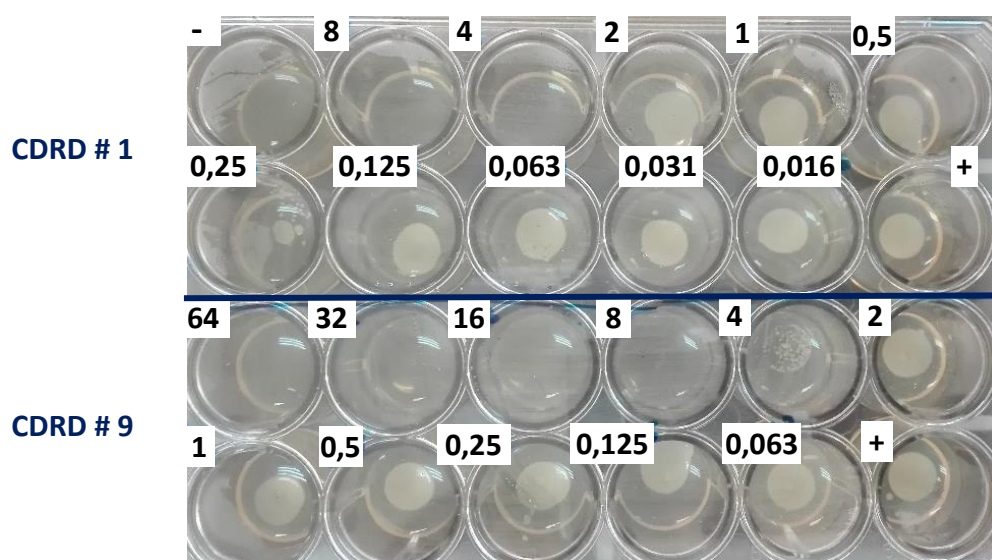
16. Bloemberg GV, Keller PM, Stucki D, Trauner A, Borrell S, Latshang T, et al. Acquired Resistance to Bedaquiline and Delamanid in Therapy for Tuberculosis. *N Engl J Med*. 2015 Nov 12;373(20):1986–8.
17. Koh W-J, Stout JE, Yew W-W. Advances in the management of pulmonary disease due to *Mycobacterium abscessus* complex. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. 2014 Oct;18(10):1141–8.
18. Martínez González S, Cano Cortés A, Yoldi S, Alfonso L, García G, María J, et al. *Micobacterias no tuberculosas*. ¿Una amenaza emergente? *Arch Bronconeumol*. 2017 Oct 1;53(10):554–60.
19. Ferro BE, van Ingen J, Wattenberg M, van Soolingen D, Mouton JW. Time-kill kinetics of antibiotics active against rapidly growing mycobacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Mar;70(3):811–7.
20. Boucher HW, Talbot GH, Benjamin DK, Bradley J, Guidos RJ, Jones RN, et al. 10 × '20 Progress—Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: An Update From the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2013 Jun 15;56(12):1685–94.
21. Kostyanev T, Bonten MJM, O'Brien S, Steel H, Ross S, François B, et al. The Innovative Medicines Initiative's New Drugs for Bad Bugs programme: European public–private partnerships for the development of new strategies to tackle antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Feb 1;71(2):290–5.
22. Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Mar;5(3):175–86.
23. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Jan;13(1):42–51.
24. Wright GD. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem Commun*. 2011 Mar 22;47(14):4055–61.
26. Gullberg E. Selection of Resistance at very low Antibiotic Concentrations. PhD thesis. Uppsala University. 2014.
26. De Rossi E, Aínsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev*. 2006 Jan;30(1):36–52.
27. Dolejska M, Villa L, Poirel L, Nordmann P, Carattoli A. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Jan;68(1):34–9.
28. Li G, Zhang J, Li C, Guo Q, Jiang Y, Wei J, et al. Antimycobacterial activity of five efflux pump inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Antibiot (Tokyo)*. 2016 Mar;69(3):173–5.

29. Rampioni G, Pillai CR, Longo F, Bondi R, Baldelli V, Messina M, et al. Effect of efflux pump inhibition on *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome and virulence. *Sci Rep*. 2017 Sep 12;7(1):11392.
30. Srikrishna G, Gupta S, Dooley KE, Bishai WR. Can the addition of verapamil to bedaquiline-containing regimens improve tuberculosis treatment outcomes? A novel approach to optimizing TB treatment. *Future Microbiol*. 2015;10(8):1257–60.
31. Gupta S, Tyagi S, Bishai WR. Verapamil increases the bactericidal activity of bedaquiline against *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jan;59(1):673–6.
32. Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius NC, Leon R, Jimenez A, Hernandez-Pando R, et al. Rifampicin reduces susceptibility to ofloxacin in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* through efflux. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jul 15;184(2):269–76.
33. Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Jan;6(1):29–40.
34. Gwynn MN, Portnoy A, Rittenhouse SF, Payne DJ. Challenges of antibacterial discovery revisited. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Dec;1213:5–19.
35. Keseru GM, Makara GM. Hit discovery and hit-to-lead approaches. *Drug Discov Today*. 2006 Aug;11(15–16):741–8.
36. Matano LM, Morris HG, Wood BM, Meredith TC, Walker S. Accelerating the discovery of antibacterial compounds using pathway-directed whole cell screening. *Bioorg Med Chem*. 2016 15;24(24):6307–14.
37. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol*. 2011 Mar;162(6):1239–49.
38. Hughes D, Karlén A. Discovery and preclinical development of new antibiotics. *Ups J Med Sci*. 2014 May;119(2):162–9.
39. Biran A, Yagur-Kroll S, Pedahzur R, Buchinger S, Reifferscheid G, Ben-Yoav H, et al. Bacterial genotoxicity bioreporters. *Microb Biotechnol*. 2010 Jul;3(4):412–27.
37. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. 2012.
41. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Apr;55(4):500–5.

42. Ioerger TR, O'Malley T, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Mohaideen N, et al. Identification of New Drug Targets and Resistance Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. PLOS ONE. 2013 Sep 23;8(9):e75245.
43. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. J Antimicrob Chemother. 2003 Jul;52(1):1.
40. EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clin Microbiol Infect. 2000 Sep;6(9):503–8.
45. Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis updated. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2007 Mar 1;44(5):681–8.
46. Quintana AL. Investigation of new mechanisms of intrinsic antibiotic resistance in mycobacteria. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, 2010.
47. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. Clin Microbiol Infect. 9(8):ix–xv.
48. Li X-Z, Nikaido H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update. Drugs. 2009 Aug 20;69(12):1555–623.
49. Schmitz FJ, Fluit AC, Hafner D, Beeck A, Perdikouli M, Boos M, et al. Development of resistance to ciprofloxacin, rifampin, and mupirocin in methicillin-susceptible and -resistant Staphylococcus aureus isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Nov;44(11):3229–31.
50. Pérez A, Poza M, Fernández A, del Carmen Fernández M, Mallo S, Merino M, et al. Involvement of the AcrAB-TolC Efflux Pump in the Resistance, Fitness, and Virulence of Enterobacter cloacae. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Apr;56(4):2084–90.
51. Martínez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Jul;44(7):1771–7.
52. Leeds JA, Sachdeva M, Mullin S, Barnes SW, Ruzin A. In vitro selection, via serial passage, of Clostridium difficile mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin. J Antimicrob Chemother. 2014 Jan;69(1):41–4.
53. Pulido MR, García-Quintanilla M, Gil-Marqués ML, McConnell MJ. Identifying targets for antibiotic development using omics technologies. Drug Discov Today. 2016 Mar;21(3):465–72.

ANEXOS

Anexo I. Determinación de la CIM de los compuestos CDRD #1 (parte superior) y CDRD #9 (parte inferior) en medio sólido MH II, al sembrar 10^5 UFC totales. Se indica la concentración de agente antimicrobiano ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en cada pocillo de la placa. (+) Control positivo. (-) Control negativo.



Anexo II. CIM de PA β N, CCCP, REP o VER (compuestos con actividad EPI) frente a diversas cepas bacterianas, determinada en medio líquido MH II. Se muestran los resultados de dos replicados técnicos.

Cepa bacteriana	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	PA β N	CCCP	REP	VER
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	256	16	256	256
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	32	2	2048	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	256	32	256	256
<i>Staphylococcus aureus</i>	32	1	2048	64