

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR IV



TESIS DOCTORAL

**Enterococcus, Salmonella y H₂S. Control remoto de la
resistencia a antibióticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Vincent Thomas López

DIRECTOR

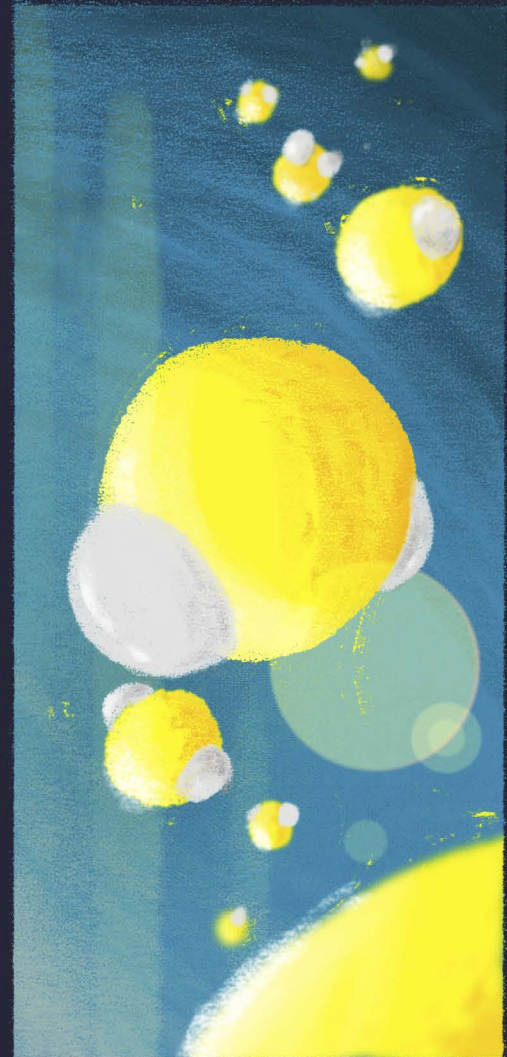
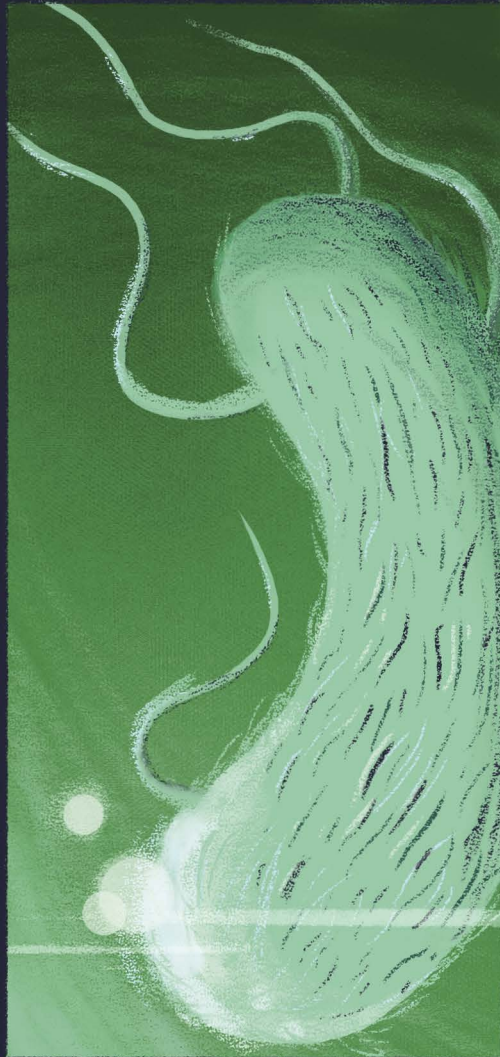
Bruno González Zorn

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



Enterococcus, Salmonella y H₂S

Control remoto de la resistencia a antibióticos

Daniel Vincent Thomas López

Madrid, 2017

Tesis Doctoral



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



TESIS DOCTORAL

Enterococcus, Salmonella y H₂S
Control remoto de la resistencia a antibióticos

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR

Daniel Vincent Thomas López

Bajo la dirección del Profesor

Bruno González Zorn

Madrid, mayo de 2017



D. Bruno González Zorn, Profesor Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM),

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada

“Enterococcus, Salmonella y H₂S: Control remoto de la resistencia a antibióticos”

presentada por Don Daniel Vincent Thomas López, Licenciado en Veterinaria y Máster en Investigación en Ciencias Veterinarias por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo mi dirección en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria, dentro del programa de tercer ciclo “Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina”, y estimamos que cumple todos los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

De acuerdo con la normativa vigente, firmo el presente certificado, autorizando a su defensa y presentación, como director de la mencionada tesis doctoral.

Madrid, mayo de 2017

Fdo.: Dr. Bruno González Zorn

A mis padres
A mi hermano

*C'est le temps que tu as perdu pour ta rose
qui fait ta rose si importante.*

Antoine de Saint-Exupéry, Le Petit Prince

AGRADECIMIENTOS

*Well, this is just a simple song,
To say what you've done.*

The Shins, Simple song

Dicen por ahí que hacer una tesis doctoral es duro; no seré yo quien lo niegue. Sin embargo, nadie me había comentado que escribir los agradecimientos fuera igual de difícil. Ahora bien, ya puestos, me vais a disculpar, pero no voy a ser breve. Para todos aquellos que os canséis de leer, podéis imaginaros que este es mi discurso por ganar el Oscar y pasar la página a los 45 segundos xD. No me sentiré ofendido. Pero ya os advierto que, entre las cientoypico páginas siguientes, no hay resultados estadísticamente más significativos que los que a continuación aparecen citados (y aquí acaba mi amistad con la estadística...). Así que, **gracias:**

En primer lugar a mis padres, por haber dado todo de su parte para que mi hermano y yo seamos hoy como somos y lo que somos. Por habernos enseñado a creer, a confiar y a tener fe en nuestra vida. Y por habernos inculcado unos principios que, por si alguna vez lo han dudado, mejores no podrían haber sido.

A mi hermano, porque me ha apoyado siempre desde la esquina del mundo en la que se encuentre, aunque él siga sin entender por qué Petri no se ocupa de sus propias placas... Por haberme donado su portátil, el cual me ha acompañado desde mi primer día de laboratorio hasta el último. Y por haber diseñado la cubierta de esta Tesis :).

Al resto de mi familia, especialmente a mis abuelitas y a esa sección zamorana que sigue insistiéndome para que les visite con más frecuencia ;).

A mis amigos de la facultad, tanto los que me acompañaron durante la carrera como los que aparecieron después. Sabéis cuánto disfruté esos años :). Especialmente gracias a los miembros del Consejo, Cristóbal y (Pablo) Zafra, por haberse demostrado (y estad atentos que no lo repetiré, hehe) irrenunciables e irremplazables a lo largo del tiempo. Y a Sara, por ser apoyo fundamental en mis mejores y peores momentos, y por que lo siga siendo siempre (¡por favor!).

To Budapest and my Erasmus family, because few experiences have been so meaningful in my life. And to the hope of seeing you again and again, anywhere, anyhow.

A mi familia urbana martinhera, por haberme acogido con tanto cariño. A mis compañeras de piso Noelia, Elena y, durante largo tiempo, María, por aceptarme cada día con todas mis (im)perfecciones :p. A María en particular por suministrarme tupperes a mansalva e inundar de estética mi mundana vida práctica. Me quedo con muy buenos recuerdos ;).

À tout le monde à Bordeaux, pour trois mois d'une vie intense (de toutes les façons).

To Milos Filipovic, for welcoming me in his lab as one more member of his team. And for always seeing bright bands where I would only see blurriness.

To Jasmina and Jan, for teaching me so much, so enthusiastically and in so little time.

To Emily & Bikash, for our moments of frustration and joy shared until (very) late at night, mostly in, but also out of the lab.

A mi tutor, evaluadores y miembros del tribunal, por haber hecho un hueco en sus apretadas agendas para leerse esta tesis.

Ahora sí (antes de que se pongan más nerviosos, hehe), a la gente con la que he compartido laboratorio durante todos estos años. Antes de nada, gracias por vuestro tiempo dedicado a revisar esta Tesis.

A Bruno, por haber confiado en mí desde hace tanto tiempo y haberme dado la oportunidad de formar parte de su maravilloso equipo. Por los momentos buenos, que han sido muchos y muy buenos, y por los malos, que tampoco han sido escasos, pero como él siempre dice, "Dinch faren sugen bist weisste, der spiekel blafen kandemohr " :).

A Nata, por su incansable (y nada silenciosa) ayuda. Por ser nuestro primer recurso, pero también el último. Y por abrirnos las puertas de su casa y de su familia :)

A Carri y a Steph, maestras del enterococo (si se dejara amaestrar... ㄟ), por haberme enseñado todo lo que se debe hacer (y lo que no, hehe) en el laboratorio. Especialmente a Carri (y sus locuras xD), por haberme acogido las noches de fiesta, ayudado los días de estrés y alimentado con comidas "ligeritas" (a mí y a medio Departamento).

A LaU y Belén, por los buenos momentos hablando de cine, de ciencia o de todo eso que sabéis que no suelo hablar xD.

A Cris (y nuestro día especial), Cristina (y nuestras cenas privadas, para 2 o para 6) y ~~Nuevo~~ Jose (y nuestras diálogos en avestruz), por su especial conexión en tantas cosas, dentro y fuera del laboratorio, ya sean tardes de juegos, noches de quizz, madrugadas de Oscars o *road-trips* por el norte :).

A Andreas y Gabi, buenrollistas donde los haya, porque cuando necesitas una mano te dan un brazo. Al *german* especialmente por la *plethora* de textos que le ha tocado traducir y convertir en *awesome*; el laboratorio te debe mucho ;).

A Manu y Bosco, por haber contrarrestado con su buen humor mis malos humos (y no me refiero al H₂S) durante mi *sprint* final xD.

A Mónica Suárez y a sus becarios (especialmente Elías), profesora, casera, compañeros y vecinos a lo largo de esta tesis.

A Jose(lito). Por llegar en el momento justo para ser un soplo de aire fresco y motivación.

A aquellos que, de una forma u otra, me han aportado a lo largo de los años. Los Osletenses, the Cambridge crew, Pablo Murcia y Sophie Granier (primeros mentores científicos), M^a Luisa Rojas (cuyas antiguas lecciones de Química han resultado vitales), Sarah, mis amigas de Alcalá, “los del insti”, los amigos de Sara (a veces, igual de veterinarios)... y alguno más que me acordaré al día siguiente de encuadernar la Tesis...

A Hans Zimmer, Alexandre Desplat, James Horner... y, obviamente, John Williams. Sin su música habría sido mucho más difícil inspirarse.

Y a los deadlines, ¡benditos deadlines!

A todos, por haberme dado más de lo que he dado yo,

Gracias

Thanks

Merci

Danke

Köszönöm

TABLA DE CONTENIDOS

We'll cross that bridge when we come to it.

Proverbio inglés

TABLA DE CONTENIDOS.....	iii
I. Figuras.....	vii
II. Tablas.....	viii
III. Abreviaturas utilizadas.....	ix
RESUMEN / SUMMARY.....	1
I. Resumen.....	3
1.1. Resumen corto.....	3
1.2. Resumen largo.....	4
II. Summary.....	11
2.1. Short summary.....	11
2.2. Long summary.....	12
INTRODUCCIÓN.....	19
I. El género <i>Enterococcus</i>.....	21
1.1. Generalidades y especies de interés.....	21
1.1.1. Interés de los enterococos en la industria alimentaria.....	23
1.2. Características bioquímicas. Metabolismo oxidativo.....	25
1.2.1. Metabolismo oxidativo.....	26
1.3. Patogénesis y virulencia.....	31
1.3.1. Determinantes de superficie.....	31
1.3.2. Factores de secreción.....	33
1.4. Vías y factores implicados en la infección por <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	33
1.5. Resistencia a antibióticos y otros agentes.....	35
1.5.1. Resistencia a gluco péptidos.....	36
1.5.2. Resistencia a aminoglucósidos.....	36
1.5.3. Resistencia a rifampicina y otros.....	37
1.5.4. Resistencia a β -lactámicos: penicilinas y carbapenemas.....	38
1.5.5. Resistencia a β -lactámicos: cefalosporinas.....	41
1.6. Relevancia clínica de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	46
II. El ácido sulfhídrico.....	49
2.1. Evolución del estudio de los gasotransmisores: óxido nítrico, monóxido de carbono, ácido sulfhídrico.....	50
2.2. Bioquímica y biología del H ₂ S.....	54

2.2.1. Vías de acción del H ₂ S	56
2.2.2. Herramientas para la detección del efecto del H ₂ S.....	62
2.3. El H ₂ S en la microbiología. Vías de producción.....	64
2.3.1. Reducción disimilatoria y asimilatoria del sulfato.....	65
2.3.2. Reducción del tetrionato y el tiosulfato.....	66
2.3.3. Producción de H ₂ S en Procariotas por los genes ortólogos a Eucariotas	68
2.3.4. Técnicas de detección de la producción de H ₂ S en microbiología.....	69
2.4. Relación entre H ₂ S, microbiota y hospedador	70
2.5. Relación del H ₂ S con la resistencia a antibióticos	72
OBJETIVOS.....	75
MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
1. Cepas y medios utilizados.....	81
2. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos	81
2.1. Antibiogramas.....	81
2.2. Determinación de la Concentración Mínima inhibitoria (CMI).....	82
2.3. Curvas de crecimiento y de supervivencia	83
3. Enfrentamientos	83
4. PCRs, manipulación de ADN y secuenciación.....	84
5. Preparación de células electrocompetentes	86
6. Construcción de mutantes de delección de <i>S. Typhimurium</i>	87
6.1. Amplificación del operón <i>phsABC</i> a deleccionar	87
6.2. Sustitución del operón <i>phsABC</i> por el cassette de resistencia a kanamicina ..	88
6.3. Excisión del cassette de resistencia a kanamicina.....	89
7. Selección de mutantes resistentes a cefotaxima-H ₂ S.....	89
7.1. Mutagénesis por transposición aleatoria	89
7.2. Mutagénesis espontánea.....	91
8. Medición de la producción bacteriana de H ₂ S.....	93
8.1. Detección en medio Kligler.....	93
8.2. Detección con tiras de acetato de plomo.....	93
9. Determinación de la sulfhidrilación interna	94
9.1. Extracción total de proteínas de <i>Enterococcus faecalis</i>	94
9.2. Marcaje por fluorescencia de las muestras.....	95
9.3. Análisis de las muestras	97

RESULTADOS.....	99
I. Efecto del H₂S sobre las bacterias y reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas en <i>E. faecalis</i>	101
1.1. Efecto del H ₂ S sobre el perfil de antibiorresistencia	102
1.2. Reversión de la resistencia a cefalosporinas en <i>Enterococcus</i>	103
1.3. Curvas de crecimiento de <i>E. faecalis</i>	109
II. Fisiología del H₂S en <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	111
2.1. Caracterización de la producción de H ₂ S en <i>Salmonella</i> Typhimurium	112
2.2. Influencia del H ₂ S en el crecimiento y en la resistencia a antibióticos de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	114
2.3. Producción de H ₂ S por <i>E. coli</i> a partir del operón de <i>S. Typhimurium</i>	115
III. Interacción entre <i>Salmonella</i> y <i>Enterococcus</i>	117
3.1. Reversión de la resistencia a cefalosporinas de <i>E. faecalis</i> por <i>S. Typhimurium</i>	117
3.2. Reversión de la resistencia a cefalosporinas de <i>E. faecalis</i> por una cepa de <i>E. coli</i> productora de H ₂ S.....	118
3.3. Interacción de <i>S. Typhimurium</i> con otras especies.....	118
3.4. Enfrentamientos en anaerobiosis.....	119
IV. Análisis proteómico y genético de <i>Enterococcus</i> en presencia de H₂S.....	120
4.1. Mutagénesis espontánea	120
4.1.1. Análisis de genomas.....	121
4.2. Mutagénesis por transposición aleatoria.....	122
4.3. Caracterización preliminar de la sulfhidrilación interna de proteínas	123
4.4. Análisis <i>in silico</i> de proteínas implicadas en la reversión de la resistencia a cefalosporinas en <i>Enterococcus</i> y susceptibles de ser modificadas por el H ₂ S.....	125
DISCUSIÓN	127
I. Efecto del H₂S sobre diferentes bacterias y sobre la resistencia a antibióticos en <i>Enterococcus</i>	129
1.1. Tolerancia de las bacterias al H ₂ S.....	129
1.2. Perfil de resistencia de <i>Enterococcus</i> en presencia del H ₂ S.....	130
1.2.1. Efecto sinérgico del H ₂ S con las cefalosporinas	130
1.2.2. Interacción del H ₂ S con otros antibióticos en <i>E. faecalis</i>	132
II. Fisiología del H₂S en <i>S. Typhimurium</i>	135
2.1. Caracterización del operón <i>phsABC</i> de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	135
2.1.1. Producción de H ₂ S por <i>S. Typhimurium</i>	135
2.1.2. Función del operón PHS	136

2.1.3. Producción de H ₂ S por la vía PHS en <i>E. coli</i>	138
III. Reversión de la resistencia a cefalosporinas de <i>Enterococcus</i> por <i>S. Typhimurium</i>	139
IV. Estudio de la sulfhidrilación interna de <i>E. faecalis</i>.....	141
V. Análisis <i>in silico</i> de posibles genes y proteínas implicados en la reversión de la resistencia a cefalosporinas por el H₂S	145
5.1. Proteínas vinculadas con la resistencia a cefalosporinas.....	146
5.2. Proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y otras candidatas.....	147
5.3. El operón <i>pyr</i>	149
5.4. El mutante espontáneo EF2466.....	152
VI. Experimentos futuros.....	154
VII. Implicaciones y trascendencia del trabajo.....	156
CONCLUSIONES.....	159
ANEXOS	163
I. Perfil de antibiorresistencia en presencia de H ₂ S	165
II. Proteínas candidatas con cisteínas	168
III. Análisis estadístico de los experimentos de fluorimetría.....	171
BIBLIOGRAFÍA	173

I. Figuras

Figura 1. Clasificación taxonómica del género <i>Enterococcus</i>	22
Figura 2. <i>Enterococcus</i> observado por microscopía electrónica	26
Figura 3. Letalidad de los antibióticos a través del estrés oxidativo	30
Figura 4. Diseminación de los enterococos en el ambiente intrahospitalario.....	35
Figura 5. Actividad de la D,D-transpeptidasa y de la L,D-transpeptidasa	40
Figura 6. Principales vías de acción de NO, CO y H ₂ S	53
Figura 7. Equilibrio del H ₂ S.....	55
Figura 8. Estructuras químicas de la cisteína y los derivados del residuo tiol.....	60
Figura 9. Técnica <i>tag-switch</i>	63
Figura 10. Producción de H ₂ S a partir de cisteína.....	68
Figura 11. Ciclo del metabolismo del H ₂ S en el aparato digestivo	71
Figura 12. Enfrentamientos entre <i>Salmonella</i> Typhimurium y otras especies	84
Figura 13. Protocolo para delección de genes manteniendo el marco de lectura.....	88
Figura 14. Plásmido pZXL5	90
Figura 15. Identificación de la región genómica con el transposón insertado.....	91
Figura 16. Protocolo de creación de una placa con gradiente de antibiótico	92
Figura 17. Escala de valores de producción de H ₂ S.....	93
Figura 18. Marcaje de los residuos de cisteína que reaccionan con el H ₂ S.....	96
Figura 19. NaHS y efecto sinérgico del mismo en un antibiograma	102
Figura 20. Antibiograma de <i>E. faecalis</i> V583 en presencia de H ₂ S	103
Figura 21. Estructura química de diferentes cefalosporinas.....	105
Figura 22. Antibiogramas de <i>E. faecium</i> presencia de H ₂ S.....	107
Figura 23. Curvas de crecimiento de <i>E. faecalis</i> JH2-2.....	110
Figura 24. PCRs del operón <i>phsABC</i> de <i>S. Typhimurium</i>	113
Figura 25. Detección por tiras de Pb(Ac) ₂ de la producción de H ₂ S	113
Figura 26. Curvas de crecimiento de <i>S. Typhimurium</i>	114
Figura 27. Producción de H ₂ S en medio Kligler.....	116
Figura 28. Enfrentamientos de <i>E. faecalis</i> JH2-2 con <i>S. Typhimurium</i>	118
Figura 29. Secuencias de mutantes espontáneos resistentes a H ₂ S-cefotaxima.....	121
Figura 30. Experimentos de fluorescencia	124
Figura 31. Región 5'-UTR del operón <i>pyr</i> de <i>E. faecalis</i>	150
Figura 32. Mecanismo de autorregulación del operón <i>pyr</i>	151
Figura 33. Estructuras secundarias de la región 5'-UTR del operón <i>pyr</i>	151

II. Tablas

Tabla 1. Especies consideradas por la OMS de prioridad máxima.....	48
Tabla 2. Propiedades físico-químicas del oxígeno y de los tres gasotransmisores...	52
Tabla 3. Lista de cepas utilizadas en este trabajo	82
Tabla 4. Lista de cebadores utilizados en este trabajo.....	85
Tabla 5. Lista de plásmidos utilizados en este trabajo.....	85
Tabla 6. Antibiogramas de <i>E. faecalis</i> V583 en ausencia y presencia de H ₂ S.....	104
Tabla 7. Antibiogramas de <i>E. faecalis</i> V583 en ausencia y presencia H ₂ S.....	106
Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria de <i>E. faecalis</i> JH2-2 WT con H ₂ S.....	109
Tabla 9. Nivel de producción de H ₂ S por <i>Escherichia coli</i>	112
Tabla 10. Enfrentamientos de <i>E. faecalis</i> JH2-2 WT con <i>E. coli</i>	118
Tabla 11. Enfrentamientos en anaerobiosis de JH2-2 WT contra <i>S. Typhimurium</i>	119
Tabla S1. Antibiogramas de diferentes especies en presencia de H ₂ S	165
Tabla S2. Antibiogramas de <i>S. Typhimurium</i>	166
Tabla S3. Antibiogramas de <i>E. coli</i>	167
Tabla S4. Proteínas relacionadas con la resistencia a cefalosporinas	168
Tabla S5. Proteínas relacionadas con el estrés oxidativo en <i>Enterococcus</i> y otras candidatas.....	169
Tabla S6. Resultados de los experimentos de fluorimetría.....	171
Tabla S7. Análisis de Varianza de los resultados de fluorimetría	171

III. Abreviaturas utilizadas

- ARNm:** ARN mensajero
CEC: cefaclor
CINO₂BF: 4-Cloro-7-nitrobenzofurazan
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
CO: monóxido de carbono
CTX: cefotaxima
Cu(II)-TBTA: Cobre(II)-Tris(benzyltriazolylmethyl)amine
D.O.: densidad óptica
DAz-2: 4-(3-azidopropyl)ciclohexano-1,3-diona
FDA: Food and Drug Administration
H₂S: ácido sulfhídrico
MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
NaHS: Hidrogenosulfuro de sodio
NO: óxido nítrico
O/N: overnight
OMS: Organización Mundial de la Salud
RBS: *ribosomal binding site* (sitio de unión del ribosoma)
rpm: revoluciones por minuto
SDS: sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*
TSA: Soja-Triptona Agar
TSB: Soja-Triptona Caldo
T-S: tiosulfato sódico
UFC: Unidades Formadoras de Colonia
VRE: *Enterococcus* resistente a vancomicina
WT: *wild type* (cepa silvestre)

RESUMEN / SUMMARY

Un peu de science éloigne de Dieu, mais beaucoup y ramène.

Louis Pasteur

I. Resumen

1.1. Resumen corto

Enterococcus faecalis y *Enterococcus faecium* son dos de los principales patógenos nosocomiales a nivel mundial, ocasionando cuadros de endocarditis, infecciones urinarias y septicemias. Esto se debe, entre otras razones, a su elevada resistencia a condiciones adversas del medio y a multitud de antibióticos.

Entre los mecanismos que presentan los enterococos para resistir a los antimicrobianos, el de mayor trascendencia clínica es su resistencia intrínseca a las cefalosporinas (un valioso grupo de antibióticos perteneciente a la familia de los beta-lactámicos), lo que limita las opciones terapéuticas disponibles para combatir las infecciones provocadas por estas especies.

En la presente Tesis Doctoral, hemos descubierto un fenómeno capaz de anular la resistencia intrínseca de *Enterococcus*, volviéndole susceptible a la acción de las cefalosporinas. Esto ocurre cuando los enterococos son expuestos a la presencia del ácido sulfhídrico, abreviado como H₂S. Este gas, considerado durante siglos como un metabolito celular de desecho, está reconocido actualmente como un gasotransmisor de gran importancia, regulando diferentes procesos fisiológicos y patológicos en Eucariotas así como en Procariotas.

Profundizando en nuestro trabajo, hemos encontrado que la resistencia a las cefalosporinas de *Enterococcus* no solo se revierte al añadir H₂S al medio, sino que el mismo resultado tiene lugar cuando el H₂S es producido y excretado por otra bacteria, incluso aunque ambas especies se sitúen físicamente separadas entre sí.

Por tanto, esta Tesis presenta avances importantes en dos temas. Por un lado, el hecho de que *Enterococcus* sea susceptible a la combinación de las cefalosporinas con el H₂S abre la puerta al diseño de futuras alternativas terapéuticas frente a patógenos multirresistentes.

Por otro lado, hasta donde sabemos es la primera vez que se describe la capacidad de una bacteria para producir, a distancia, un efecto con consecuencias letales sobre otra bacteria, resultado sorprendente, una vez más, la complejidad del mundo bacteriano.

1.2. Resumen largo

Los enterococos son cocobacilos gram positivos pertenecientes al phylum Firmicutes y el orden Lactobacillales, donde cuentan con su propia familia *Enterococcaceae*. Son bacterias ubicuas, presentes con frecuencia en el tracto digestivo no sólo del ser humano, sino de animales tanto vertebrados como invertebrados. Además, también se han aislado en plantas, suelo y agua.

Por sus propiedades ácido-lácticas, en ocasiones se utilizan en la industria alimentaria como cultivos iniciadores o en la fermentación y maduración de quesos y embutidos. También se ha contemplado su uso como probióticos por su producción de enterocinas y su capacidad de competición para adherirse al epitelio intestinal.

Sin embargo, el principal motivo de estudio de los enterococos hoy en día, que limita además su utilización en la industria, es su papel como patógeno nosocomial. *Enterococcus faecalis*, desde finales de los años 80, y *Enterococcus faecium*, en los últimos años, se encuentran entre los principales patógenos hospitalarios a nivel mundial, produciendo cuadros de endocarditis, septicemia e infecciones urinarias.

Entre las razones por las que *Enterococcus* se ha situado este año 2017 entre los doce patógenos multirresistentes de mayor importancia para la Organización Mundial de la Salud se incluye su capacidad para resistir las condiciones adversas del medio. Son bacterias termodúricas, creciendo en un rango amplio de temperaturas, y resisten niveles elevados de pH y sales biliares. Además, presentan una amplia batería de enzimas para resistir al estrés oxidativo, habiéndose relacionado varias de ellas con su virulencia o con la resistencia a antibióticos.

Este último aspecto, su tolerancia o resistencia a una gran variedad de antimicrobianos, es el más preocupante desde una perspectiva clínica. Por un lado, los enterococos exhiben diferentes grados de resistencia intrínseca a diversos antibióticos, incluyendo la mayoría de los β -lactámicos y los aminoglucósidos. Pero, además, han sido capaces de adquirir o desarrollar mecanismos de resistencia frente a muchos otros agentes, en parte gracias a la elevada plasticidad de su genoma.

Uno de los antibióticos frente a los que la resistencia de los enterococos causa más estragos es la vancomicina, un fármaco utilizado en muchas ocasiones como último recurso terapéutico. Los VRE (*Vancomycin Resistant Enterococci*), que emergieron a finales del siglo XX, no sólo limitan la el uso terapéutico de la vancomicina, sino que además son capaces de diseminar el determinante de resistencia a otras especies, como al patógeno nosocomial MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina).

El otro gran obstáculo cuando nos enfrentamos a *Enterococcus* es su resistencia intrínseca a las cefalosporinas, un grupo de β -lactámicos ampliamente utilizado en la clínica y considerada de necesidad crítica para el tratamiento de infecciones por bacterias multirresistentes. Estos agentes, al igual que todos los β -lactámicos, actúan inhibiendo a las PBPs (*Penicillin Binding Proteins*) encargadas de la síntesis de la pared bacteriana.

Los enterococos cuentan con una PBP de baja afinidad a las cefalosporinas que les permite continuar con la síntesis de la pared aun cuando todas las demás están saturadas por el antibiótico. No obstante, a día de hoy se han descrito una decena de factores adicionales y necesarios para que los enterococos exhiban su resistencia a cefalosporinas. Las rutas implicadas no se entienden plenamente y es por ello por lo que es un tema constantemente en estudio.

Al margen de los enterococos, un campo novedoso y poco explorado dentro del extenso mundo de la resistencia a antibióticos es el papel que los gasotransmisores juegan en el mismo. Los gasotransmisores son pequeñas moléculas gaseosas, principalmente óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO) y ácido sulfhídrico (H₂S), que intervienen en diferentes procesos fisiológicos y patológicos tanto en células eucariotas como procariotas. Por ello, hoy en día se está estudiando el empleo de moléculas donadoras de H₂S a nivel clínico.

En las bacterias, se ha demostrado que el H₂S fomenta la resistencia global a los antimicrobianos porque es capaz de proteger del estrés oxidativo desencadenado por diversos antibióticos y responsable del efecto bactericida de los mismos. Esta podría ser la razón por la que algunas especies bacterianas producen H₂S en grandes cantidades y sin un motivo aparente, como es el caso de *Salmonella Typhimurium*. Por otra parte, también se ha descrito que los enterococos son capaces de inhibir la producción de H₂S por otras bacterias, sin que se haya indagado en las razones ni los mecanismos responsables de dicho fenómeno.

Por tanto, el siguiente trabajo de Tesis doctoral partió de la necesidad de profundizar en los mecanismos responsables de la resistencia a antibióticos en *E. faecalis* y *E. faecium* (con especial atención a su resistencia a cefalosporinas) y de

nuestro interés en indagar en la relación del H₂S con la resistencia a antibióticos en diferentes especies.

Inicialmente, llevamos a cabo un *screening* general para observar si el H₂S alteraba el perfil de resistencia de diversas bacterias, incluyendo gram positivas y gram negativas de interés clínico. Sin embargo, en ninguna de ellas observamos cambios sustanciales, aunque sí comprobamos que la tolerancia de las bacterias al H₂S varía considerablemente.

En cambio, los experimentos preliminares con *E. faecalis* mostraron un resultado sorprendente: la presencia de H₂S revierte la resistencia intrínseca a cefalosporinas que posee este patógeno. El desarrollo de estos experimentos demostraron que efectivamente, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cefotaxima (una cefalosporina ampliamente utilizada clínicamente) en presencia de H₂S, tanto para la cepa de laboratorio JH2-2 como para la cepa clínica V583 (una cepa VRE), se reducía hasta 100 veces. Además, esta inducción de la susceptibilidad ocurría de una manera semejante en *E. faecium* ATCC19434. No solo eso, sino que observamos que, dado que el H₂S es un gas, no hacía falta que la fuente de H₂S se encontrara en el mismo medio que el enterococo.

Dado que existen diferentes bacterias capaces de producir H₂S, como es el caso de *S. Typhimurium*, nos preguntamos si la reversión de la resistencia también podría ocurrir en un contexto biológico y, atendiendo a la naturaleza gaseosa del H₂S, si podía tener lugar aunque ambas bacterias se encontraran físicamente separadas. Por ello, desarrollamos una técnica para enfrentar *S. Typhimurium* y *E. faecalis* y observamos que, efectivamente, también se producía una pérdida de la resistencia a cefalosporinas.

Para corroborar que *S. Typhimurium* actúa sobre el enterococo a través del H₂S producido por ella misma, delecionamos el operón *phsABC*, conocido clásicamente como la vía PHS, la principal ruta de producción de H₂S en esta especie. Como cabía sospechar, este mutante no es capaz de afectar a la resistencia exhibida por el enterococo.

Al mismo tiempo, la construcción de este mutante nos permitió caracterizar la funcionalidad de la vía PHS en *Salmonella*. Por un lado, demostramos que no existen diferencias entre la bacteria silvestre y el mutante, en lo que respecta a la capacidad de crecimiento o al perfil de antibiorresistencia. Además, se sabe que existen otras vías de producción de H₂S en *Salmonella*, pero nosotros hemos comprobado que, si bien dichas vías pueden estar activas, no son utilizadas por la bacteria para expulsar H₂S al exterior, por lo que la finalidad de los diferentes mecanismos de producción de H₂S debe ser diferente.

Continuando con la vía PHS, la inserción del operón *phsABC* de *S. Typhimurium* en *Escherichia coli* puso de manifiesto que es funcional en esta bacteria y que la bacteria portadora de la misma es capaz de inducir la susceptibilidad del enterococo. No obstante, de la misma manera que en *S. Typhimurium*, no observamos ninguna diferencia en la resistencia a antibióticos entre las dos cepas de *E. coli*.

Volviendo al fenómeno de la reversión de la resistencia a cefalosporinas en *Enterococcus*, observamos que dicho fenómeno ocurría con un grupo determinado de cefalosporinas, que son aquellas que contienen un grupo metoxi-imino en su estructura. El hecho de que aparentemente sea un fenotipo muy concreto que ocurre

en unas especies muy específicas nos llevó a razonar que el H₂S debía estar actuando por un mecanismo preciso y no por un efecto general sobre la bacteria.

La mayoría de los estudios sobre el H₂S apuntan a que ejerce su función biológica al modificar postraduccionalmente, de un modo reversible, determinados residuos de cisteínas de ciertas proteínas, previa oxidación de las mismas. Por ello, decidimos aplicar la técnica de *tag-switch*, diseñada para revelar los cambios fluorimétricos en las proteínas provocados por la unión del H₂S a las cisteínas. Con ello, vimos que la cefotaxima produce un notable descenso de la fluorescencia, mientras que una cefalosporina sin grupo metoxi-imino, del mismo modo que el propio H₂S, produce un incremento de la fluorescencia. Esta diferencia podría estar relacionada con la activación de mecanismos internos que eviten una sulfhidrilación o una oxidación exacerbada de las cisteínas, pero son necesarios más estudios para poder descifrar este fenotipo.

Por último, llevamos a cabo un análisis *in silico* de las posibles proteínas diana en *E. faecalis* para la inducción de la susceptibilidad a cefalosporinas. Los principales candidatos son la proteína MurAA (implicada en el primer paso de la síntesis del peptidoglicano), la L,D-transpeptidasa (una enzima con función similar a las PBPs) y las enzimas implicadas en la síntesis de las pirimidinas y del polisacárido Epa.

Todos ellos han sido relacionados con la resistencia a cefalosporinas o a otros β-lactámicos, aunque hace falta llevar a cabo experimentos adicionales para corroborar nuestras teorías.

Para finalizar y a modo de resumen, en esta tesis hemos avanzado en el estudio de la resistencia a cefalosporinas de uno de los patógenos nosocomiales más importantes, *Enterococcus*. Hemos demostrado que es posible revertir esta resistencia intrínseca

gracias a la acción del H_2S , abriendo la puerta a posibles opciones terapéuticas en el futuro dado el empleo preclínico ya existente del H_2S .

Además, hemos demostrado cómo una bacteria puede ejercer a distancia un efecto negativo y letal sobre otra bacteria, lo que supone ir más allá en el campo de las relaciones interbacterianas y la ecología microbiana.

II. Summary

2.1. Short summary

Enterococcus faecalis and *Enterococcus faecium* are among the most significant hospital pathogens globally, producing life threatening endocarditis, urinary tract infections and septicemia. This is due, among other reasons, to their high-level of resilience to adverse environmental conditions, and to their resistance to a wide range of antibiotics.

Of all the antimicrobial resistance mechanisms harbored by enterococci, their intrinsic resistance to cephalosporins (an invaluable group of antibiotics within β -lactams family) is the most troubling from a clinical perspective, as it leads to a substantial reduction of the treatment options available for fighting enterococcal infections.

In this Thesis, we have discovered a phenomenon that abolishes *Enterococcus* resistance, making them susceptible to cephalosporin activity. This sensitization occurs when enterococi are exposed to the gas hydrogen sulfide (H_2S). This gas, which has been considered a mere cell by-product for centuries, is now recognized as a highly relevant gasotransmitter, involved in various physiological and pathological processes, both in Eukaryotes and Prokaryotes.

Furthermore, in our work we have revealed that, enterococci do not only become susceptible to cephalosporins when H_2S is in the media, but the same phenotype is observed when the H_2S is produced by another bacterium, even if both species are physically separated one from the other.

Thus, this Thesis constitutes a significant progress in two different fields. On the one hand, the fact that *Enterococcus* becomes susceptible to the combination of cephalosporins and H₂S opens the door for the development of future therapeutic alternatives against multidrug resistant pathogens.

On the other hand, to the best of our knowledge, this is the first description of a bacterium remotely producing an effect with lethal consequences on another species, demonstrating, once again, the immense complexity of the microbial world.

2.2. Long summary

Enterococci are gram positive coccobacilli that belong to the *Enterococcaceae* family within the Lactobacillales order and the Firmicutes phylum. They are ubiquitous bacteria, frequently found in the digestive tract of both humans and animals, including invertebrates. Also, enterococci have been isolated from plants, soil and water.

Due to their lactic-acid properties, they have been used in food industry as starter cultures as well as for the processing of different cheeses and meat. They have also been proposed as probiotics due to their production of enterocins and their capacity to outcompete less favorable bacteria when adhering to the intestinal epithelium.

However, the main reason for the study of enterococci these days is their relevance as a nosocomial pathogen. *Enterococcus faecalis*, since the 80s, and *Enterococcus faecium*, in the last few years, are among the most significant hospital pathogens globally, producing endocarditis, septicemia and urinary tract infections.

In 2017 enterococci were ranked among the twelfth most multiresistant pathogens, according to the World Health Organization. The reasons behind this fact include

their ability to resist adverse conditions. They are thermotolerant bacteria that grow at a wide range of temperatures, pH levels and in bile salts. In addition, they possess a plethora of enzymes to combat oxidative stress, which have been linked to *Enterococcus*' virulence and antibiotic resistance.

This last aspect, their tolerance or resistance to clinically significant antibiotics, is the most concerning from a clinical perspective. On the one hand, enterococci exhibit varying degrees of intrinsic resistance to several antimicrobial drugs, including many β -lactams and aminoglycosides. On the other hand, they have acquired or developed resistance mechanisms towards many other antibiotics, partially due to their high genomic plasticity.

The emergence of Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) at the end of the 20th century rendered this antibiotic, considered a last resort therapeutic agent, useless for the treatment of many enterococcal infections. In addition, they disseminate resistance mechanisms to other species, such as the nosocomial pathogen MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*).

The other major drawback when fighting *Enterococcus* is its intrinsic resistance to cephalosporins, a group of β -lactams widely used in clinical settings and considered by the World Health Organization as critically needed for the treatment of multiresistant bacterial infections. These drugs, like all β -lactams, carry out their bactericidal action by inhibiting the PBPs (Penicillin Binding Proteins), the enzymes responsible for cell wall synthesis.

Enterococci harbor a PBP with low affinity to cephalosporins, which allows the bacteria to continue cell wall synthesis even when the rest of the PBPs are saturated by the antibiotic. Together with this PBP, to date several other factors have been

described as necessary for the intrinsic resistance of enterococci to cephalosporins. However, the pathways involved remain unclear despite numerous studies.

A seemingly unrelated topic, and novel as well as essentially unexplored field within the vast world of antimicrobial resistance, is the involvement of gasotransmitters. These compounds are small gaseous molecules, mainly nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H₂S), which play a key role in different physiological and pathological processes, both in Eukaryotes and Prokaryotes. For this reason, NO and H₂S releasing drugs are currently under development for their use in clinical settings.

In microbiology, it has been demonstrated that H₂S promotes global antimicrobial resistance, as it is able to protect the bacteria from the lethal oxidative stress imposed by many antibiotics. This could account for the H₂S production displayed by several bacterial species without a plausible purpose, such as *Salmonella* Typhimurium. In addition, it has also been stated that enterococci can inhibit the H₂S production of other species, although the reasoning or responsible mechanisms behind this phenomenon have not yet been elucidated.

Therefore, this Doctoral Thesis addresses from the need for an in depth understanding of the mechanisms governing cephalosporin resistance in *E. faecalis* and *E. faecium* as well as from our interest in clarifying the relationship of H₂S with antibiotic resistance of many species.

Initially, we screened a set of clinically relevant bacteria, including gram positive and gram negative species, to check if their antibiotic resistance profile was

modified by the presence of H₂S. However, none of them displayed substantially different phenotypes, although we did observe that the tolerance to H₂S greatly varies among the species.

On the other hand, preliminary results with enterococci revealed an unexpected result: H₂S reverses *E. faecalis* intrinsic resistance to cephalosporins. Further development of these experiments demonstrated that the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of cefotaxime (a cephalosporin routinely used in clinical settings) was decreased 100 times in the presence of H₂S. This drastic MIC reduction was observed for both *E. faecalis* V583 (a VRE strain) and JH2-2 (a laboratory strain), as well as for *E. faecium*. Further, we demonstrated that, given the gaseous nature of H₂S, the source of the H₂S does not need to be in the same media as the enterococci.

As there are numerous bacteria described as H₂S producers in the literature, such as *S. Typhimurium*, we asked ourselves if the resistance reversion could also occur in a biological context and, as H₂S is a gas, if it could take place even if both species were physically separated. To this end, we developed a technique to face *S. Typhimurium* and *E. faecalis* and we observed that, resistance to cephalosporins was abolished in the enterococci as it happened by the presence of chemically originated H₂S.

To prove that the effect of *S. Typhimurium* on the enterococci was mediated via the H₂S produced by the former, we deleted the *phsABC* operon, commonly known as the main pathway for H₂S production in this species. As expected, this mutant was not able to modify enterococci cephalosporin resistance.

The construction of the Δphs mutant allowed us to characterize the functionality of the PHS pathway in *Salmonella*. On the one hand, we have seen that there are no significant differences between the wild-type bacteria and the deletion mutant,

regarding their growth capacity and antibiotic resistance profile. In addition, even if other H₂S mechanisms are described in *Salmonella*, we have proven that these pathways are not utilized by this bacterium to expel H₂S from the cell, even if these other pathways could be active. We believe that, therefore, the different H₂S production mechanisms must have further roles.

Continuing with the PHS pathway characterization, the transformation of *S. Typhimurium*'s *phsABC* operon in *Escherichia coli* revealed that it is functional in this species and that the carrying strain is able to induce cephalosporin susceptibility in enterococci in the same manner. Nevertheless, and as for *S. Typhimurium*, *E. coli* resistance to antibiotics was not modified by their acquired ability to produce H₂S.

Returning to the reversion of cephalosporin resistance in *Enterococcus*, we observed that this phenomenon takes place with a particular set of cephalosporins that contain a methoxy-imino group in their chemical structure. The fact that this phenotype is displayed in specific species and against a precise set of drugs led us to suspect that H₂S might be acting by a well-defined mechanism and not by exerting a general effect on the bacteria.

The majority of the studies on H₂S suggest that this compound carries out its biological function by posttranslationally modifying specific cysteine residues in certain proteins in a reversible way. Thus, we employed a *tag-switch* technique, designed to reveal fluorometric changes of the proteins caused by the binding of the H₂S to the cysteines. This way, we observed that cefotaxime notably decreases the proteins' fluorescence, while cefaclor, a non-methoxy-imino cephalosporin, increases its fluorescence, just like the samples incubated with H₂S. This difference could be related to the activation of internal mechanisms in order to avoid an excess

of cysteine sulfhydration. However, further studies must be performed to understand these results.

Finally, we carried out an *in silico* analysis of the possible targets in *E. faecalis* that may be responsible for the induction of cephalosporin susceptibility in this species. The main candidates that we propose are the MurAA protein (involved in the first step of peptidoglycan synthesis), the L,D-transpeptidase (an enzyme with a similar function to the PBPs) and the enzymes related to the pyrimidines – Epa polysaccharide synthesis. All of these proteins, in addition to harboring cysteines that play a key role in their biological function, have been associated to enterococci resistance to cephalosporins and/or other β -lactams. Further experiments are needed to confirm the hypotheses set forth by this project.

In summary, this Thesis constitutes a significant progress in the study of the cephalosporin resistance in the highly relevant nosocomial pathogens, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. We have shown that it is possible to revert this intrinsic resistance by H₂S, opening the door to future therapeutic alternatives.

Moreover, we have demonstrated that bacteria can produce a negative and lethal effect on bacteria that are physically separated, which constitutes a significant step further in the study of bacterial interactions and microbial ecology.

INTRODUCCIÓN

*There's more to see than can ever be seen,
More to do than can ever be done,
There's far too much to take in here,
More to find than can ever be found.*

Elton John, Circle of Life

I. El género *Enterococcus*

1.1. Generalidades y especies de interés

La familia *Enterococcaceae* incluye una serie de bacterias descritas por primera vez en 1899, tanto por Thiercelin & Jouhaud como por MacCallum & Hastings (Gilmore *et al.* 2014). Se encontraban inicialmente clasificadas como *Streptococcus* del grupo D de la clasificación antigénica de Lancefield hasta hace apenas 30 años, cuando fueron diferenciadas de estos en base a estudios de ADN (Schleifer & Kilpper-Balz 1984). De hecho, por análisis filogenéticos del ARNr 16S, los enterococos se encuentran evolutivamente más cerca de *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* que de los estreptococos.

La familia *Enterococcaceae* pertenece al phylum Firmicutes y clase Bacilli, al igual que otras bacterias gram positivas de alto interés clínico como son *Staphylococcus* spp. y *Listeria* spp. Estos últimos pertenecen al orden Bacillales, mientras que *Enterococcaceae*, junto con *Lactobacillae*, *Streptococcaceae* y otras familias, pertenecen al orden Lactobacillales. Hoy en día, el número de especies incluidas dentro de *Enterococcus*, el principal género de la familia *Enterococcaceae*, está aumentando rápidamente, en parte gracias a las cada vez más eficaces técnicas genómicas. En el año 2014, existían 35 especies reconocidas y otra decena estaban siendo consideradas (Gilmore *et al.* 2014). Hoy en día, de acuerdo al *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (LSPN, www.bacterio.net), existen 55 especies diferentes. De todas ellas, las dos de mayor relevancia son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (Figura 1). La siguiente tesis se centra principalmente en *E. faecalis*.

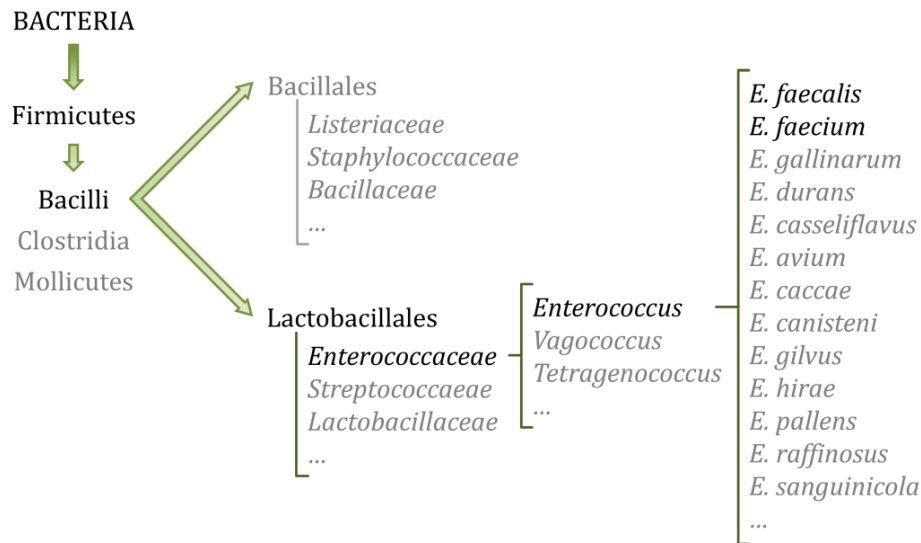


Figura 1. Clasificación taxonómica del género *Enterococcus*. Se incluyen las dos especies más relevantes así como otras ocasionalmente descritas como patógenos humanos.

Los enterococos destacan por su ubicuidad. Se pueden encontrar en el sistema digestivo de una gran variedad de animales, en una proporción de alrededor del 1%, así como en plantas. También se han aislado en el suelo o en agua, aunque estos nichos no son sus hábitats naturales y, de hecho, el aislamiento de cepas intestinales se ha utilizado como indicador de contaminación fecal del agua y de la calidad de la misma (Svec & Devriese 2015). Por otro lado, el hecho de que puedan aislarse del tracto digestivo tanto de animales vertebrados como invertebrados sugiere que estos organismos ya estaban presentes en ancestros comunes hace más de 400 millones de años (Gilmore *et al.* 2014).

Pero la importancia de *Enterococcus* radica en su emergencia como patógeno nosocomial desde finales del siglo XX, como veremos más adelante. La relevancia de las infecciones enterocócicas hizo que en el año 2008 fueran incluidas entre las bacterias agrupadas como ESKAPE (Rice 2008), que engloba a las principales responsables de infecciones hospitalarias. En este grupo, además de los enterococos resistentes a vancomicina (VRE, principalmente *E. faecium*), se incluyen los

siguientes agentes: *Enterobacter* spp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*.

1.1.1. Interés de los enterococos en la industria alimentaria

Dado que los enterococos son bacterias ácido-lácticas y homofermentativas (Svec & Devriese 2015), tienen diferentes aplicaciones en la industria alimentaria, por su actividad proteolítica y esterolítica y por su alta resistencia a cambios de pH, salinidad y temperatura. Al igual que en el campo clínico, las dos especies de mayor interés son *E. faecalis* y *E. faecium*.

Del mismo modo que otras bacterias ácido-lácticas, algunas cepas no virulentas de *Enterococcus* se utilizan como cultivos iniciadores en la fermentación y maduración de quesos tradicionales y para mejorar las cualidades organolépticas de verduras o embutidos (Giraffa 2003; Foulquié Moreno *et al.* 2006). No obstante, de igual manera pueden ejercer un papel contaminante en los alimentos, alterando sus propiedades (Giraffa 2002).

Por otra parte, el mayor inconveniente en la utilización de los enterococos en la industria alimentaria reside en su importancia como patógeno humano. A día de hoy, se siguen identificando nuevos factores de virulencia, estando algunos de estos presentes en cepas utilizadas en la industria alimentaria (Franz *et al.* 2001). Asimismo, su facilidad para intercambiar material genético agrava la potencial patogenicidad de los enterococos y su relevancia como reservorio y transmisor de determinantes de resistencia a antibióticos. Es, de hecho, la única bacteria gram positiva monitorizada rutinariamente por el NARMS (*National Antimicrobial Resistance Monitoring System*¹), pues,

¹ El NARMS forma parte de la FDA (*Food & Drug Administration*) y es un programa nacional de EEUU que engloba a los Departamentos de Salud estatales, los CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) y el USDA (*U.S. Department of Agriculture*). Monitoriza y asesora sobre la resistencia a antibióticos en cepas entéricas procedentes de pacientes, alimentos y animales de producción.

a pesar de su relevancia clínica, la información sobre su posible patogenicidad directamente a través de los alimentos es escasa (Werner *et al.* 2013).

Otro campo en el que resulta de interés la utilización de los enterococos, al igual que otras bacterias lácticas, es el de su empleo como probióticos, pues presentan ciertas ventajas respecto a otras especies, como son su resistencia a los jugos gástricos y las sales biliares, su competición por la adhesión a las células epiteliales y la producción de compuestos antimicrobianos llamados enterocinas (Araújo & Ferreira 2013). Se ha evidenciado su eficacia como probióticos al añadirse al pienso de aves y cerdos (Pollmann *et al.* 2005) y en Europa está aceptado su uso en este sector bajo una regulación específica de la EFSA (*European Food Safety Authority*), el organismo máximo en materia de seguridad alimentaria, que exige demostrar la ausencia de ciertos determinantes de patogenicidad y virulencia en la cepa utilizada (EFSA 2012). Incluso en algunos países, como Brasil, la cepa de *E. faecium* SF68 está aprobada como probiótico para tratar la diarrea en niños y prevenir los trastornos gastrointestinales causados por un tratamiento antibiótico (Araújo & Ferreira 2013).

Sin embargo, en general su utilidad en humanos se ve de nuevo limitada por su falta de seguridad. No son organismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, del inglés *generally recognized as safe*) por la FDA ni cuentan con el reconocimiento QPS (*Qualified Presumption of Safety*) de la EFSA (EFSA 2013). Se podría decir que un buen análisis del controvertido uso de los enterococos en la industria alimentaria lo dio Charles Franz cuando emplazó a los enterococos “*at the crossroads of food safety*” (Franz *et al.* 1999).

1.2. Características bioquímicas. Metabolismo oxidativo

Los enterococos son cocobacilos gram positivos, de menos de 2 micras de longitud, no esporulados y que se aíslan normalmente de forma individual, en parejas o en pequeñas cadenas (Figura 2). Sus colonias son circulares, de hasta 5 milímetros de diámetro y con una superficie lisa y brillante. En general, son bacterias no móviles, exceptuando las especies *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* (Svec & Devriese 2015).

Poseen un bajo contenido en guanina+citosina (G+C 37,5%, siendo algo menor en su ADN plasmídico), son anaerobios facultativos y negativos a la prueba de la oxidasa.

Presentan una elevada termotolerancia, de entre 10-45 °C (son bacterias termodúricas, sobreviviendo a los procesos de pasteurización), y son capaces de crecer en presencia de hasta 6,5% de NaCl, pH 9,6 o hasta 40% de contenido en sales biliares, lo que les permite proliferar en medio McConkey. Todas estas particularidades otorgan a los enterococos una gran robustez y resistencia frente al estrés ambiental en hábitats tanto bióticos como abióticos, una de las claves para su trascendencia en ambientes clínicos (Bradley & Fraise 1996). No en vano, cuando se identificaron por primera vez, los enterococos ya fueron descritos como “*very hardy and tenacious of life*” (MacCallum & Hastings 1899).

Entre otras características bioquímicas de los enterococos utilizadas para su identificación, aunque variables según especie, destacan su capacidad para utilizar el glicerol como fuente de energía en condiciones anaerobias, fermentar diferentes carbohidratos (piruvato, manitol, arabinosa, sorbosa, sorbitol y rafinosa), utilizar menaquinonas como transportadores de electrones no-citocrómicos y no requerir ácido fólico exógeno para su crecimiento (Devriese *et al.* 2006).

Por otra parte, clásicamente *Enterococcus* se ha considerado un organismo catalasa negativo, lo cual no es siempre correcto, como veremos a continuación.

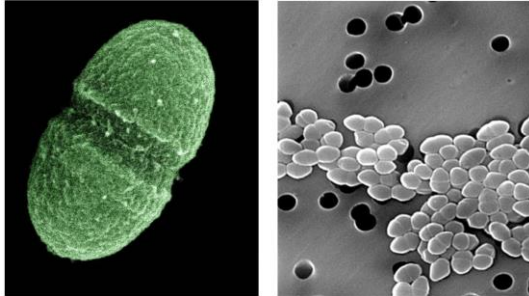


Figura 2. *Enterococcus* observado por microscopía electrónica. Cortesía del CDC (izquierda) y del USDA (derecha).

1.2.1. Metabolismo oxidativo

Los enterococos se diferencian de otras familias por una propiedad muy importante de cara a su supervivencia, que es su resistencia frente al estrés oxidativo. Disponen de una gran cantidad de enzimas para hacer frente al estrés producido por los radicales de oxígeno. Esto es particularmente importante dado que en los últimos años se ha afirmado que la consecuencia final de la acción de muchos antibióticos bactericidas (pero no de los bacteriostáticos), independientemente de su diana de acción, es un aumento intracelular de las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) que conlleva la muerte bacteriana (Prousek 2007; Kohanski *et al.* 2007). Sin embargo, es cierto que existe cierta controversia en este aspecto, pues algunos de estos artículos han sido parcialmente rebatidos posteriormente (Liu & Imlay 2013; Keren *et al.* 2013).

El estrés oxidativo tiene lugar cuando una célula no puede mantener el estado reductor fisiológico en su interior, debido a un desequilibrio entre la generación de ROS resultantes del metabolismo normal y la capacidad del organismo para eliminar dichos reactivos o remediar las alteraciones que estas moléculas le ocasionan. Clásicamente, dentro de las ROS se incluyen el

anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$).

El daño oxidativo va a desarrollarse principalmente a través de la reacción de Fenton (Figura 3). Inicialmente, el radical anión superóxido reacciona con los iones de hierro Fe^{3+} presentes en las reservas FeS celulares, reduciéndolo a Fe^{2+} . Este reacciona con peróxido de hidrógeno (proveniente del metabolismo celular o de la detoxificación del propio O_2^-), oxidándose de nuevo a Fe^{3+} al mismo tiempo que se genera $OH\cdot$, que, teóricamente, es responsable del daño celular al reaccionar con el ADN.

Para evitarlo, las células cuentan con una serie de mecanismos (Figura 3), los cuales, como ya se ha mencionado, son especialmente eficaces en *Enterococcus* y se describen a continuación, incluyendo el gen codificante en la cepa secuenciada, y de interés para esta tesis, *E. faecalis* V583:

- Superóxido dismutasa (EF0463): las superóxido dismutasas (SOD, SodA en *E. faecalis*) son metaloenzimas que catalizan la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno. Constituyen, por tanto, uno de los primeros mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo de un organismo, dado que la neutralización del anión superóxido evita el desencadenamiento de la reacción de Fenton (Verneuil *et al.* 2006). En *E. faecalis*, además de ser una de las piezas clave en su defensa frente a ROS (Rigottier-Gois *et al.* 2011), esta enzima también se considera un factor de virulencia, dado que le permite sobrevivir al estrés oxidativo generado dentro de las células fagocíticas y está involucrado en la tolerancia a varios antibióticos que podrían actuar por mecanismos de estrés oxidativo, como la penicilina o la vancomicina (Rigottier-Gois *et al.* 2011).

- Catalasa (EF1597): esta enzima pertenece al grupo encargado de degradar el peróxido de hidrógeno a H₂O y O₂. Clásicamente los enterococos se habían considerado catalasa negativos hasta que Frankenberg y colaboradores describieron en *E. faecalis* la presencia del gen *kata* (Frankenberg *et al.* 2002), codificante para una catalasa monofuncional. Este tipo de catalasas contienen hemo como grupo prostético, el cual los enterococos deben obtener del medio, dado que no poseen la maquinaria para sintetizar protoporfirina IX, su precursor. Sin embargo, a día de hoy tampoco se conoce ningún mecanismo en *E. faecalis* para la captación de hemo, por lo que la fisiología de esta enzima aún está en estudio.

El papel de la catalasa en *E. faecalis* parece ser la protección frente a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno en condiciones aerobias (Baureder *et al.* 2012). Es significativo destacar que *E. faecalis* es el único coco patógeno nosocomial gram positivo en el que se ha encontrado el gen *kata*.

- NADH peroxidasa (EF1211): es una enzima descrita en unos pocos géneros bacterianos (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*). Como su nombre indica, desdobra el peróxido de hidrógeno a H₂O y O₂. En *E. faecalis* parece que es estimulada en condiciones aerobias y que actúa frente a H₂O₂ de origen endógeno (La Carbona *et al.* 2007). Además, la interrupción de este gen *npr* se ha relacionado con la pérdida de la resistencia al antibiótico ceftriaxona (Rigottier-Gois *et al.* 2011).
- Operón Alquil hidroperóxido reductasa: está conformado por dos genes, *ahpC* (*alkyl hydroperoxide reductase subunit C*, EF2739) y *ahpF* (*thioredoxin reductase/glutathione-like protein*, EF2738). AhpC, con

función peroxidasa, es una peroxirredoxina, es decir, que cuenta con un residuo de cisteína (-SH) en su extremo N-terminal, el cual se oxida a ácido sulfénico (-SOH) tras reaccionar con el peróxido. Para resolver esta situación, se forma un puente disulfuro intramolecular con el residuo -SH de la cisteína del extremo C-terminal.

AhpF es la reductasa de AhpC, gracias a su función antioxidante TSA (*thiol-specific antioxidant*). Esta enzima, al igual que las enzimas tiorredoxina (Trx) y su correspondiente tiorredoxina reductasa (Trx-reductasa), presentan el motivo aminoacídico CXXC. Las dos cisteínas de este grupo CXXC pueden presentar los grupos tiol (-SH) libres o unidos por un puente disulfuro (-S-S)², y esta alternancia de las cisteínas entre el estado reducido y el oxidado, respectivamente, es lo que confiere a la enzima su poder antioxidante (La Carbona *et al.* 2007).

El operón *ahpC-ahpF* se encuentra bajo el control de HypR (EF2958), un regulador transcripcional activado por ROS. Se encarga de la eliminación de H₂O₂ endógeno presente en bajas concentraciones, presentando mayor afinidad por los peróxidos que la catalasa (Wang & Zhao 2009).

- Operón tiolperoxidasa: el papel del operón EF2932-EF2933 en *E. faecalis* no se entiende en su totalidad. La enzima Tpx codificada por EF2932 también cumpliría una función peroxidasa del grupo de las peroxirredoxinas, pero teniendo mayor afinidad por los alquilhidroperóxidos que por el peróxido de hidrógeno. Esta tiolperoxidasa también se ha relacionado con la capacidad infectiva del enterococo y con la formación de biofilms (Arias & Murray 2012). Parece estar bajo el

² Según el subtipo de enzima, puede formarse un puente disulfuro intramolecular o intermolecular con la cisteína de la otra subunidad del homodímero.

control negativo de la enzima Rex, codificada por el gen EF2933, que actúa como un sensor *redox* del operón.

- Represores Rex: el represor Rex codificado por EF2933, a su vez, sería reprimido por otra proteína Rex (EF2638), la cual se activa ante niveles altos de NAD⁺ y se reprime ante niveles altos de NADH (Vesić & Kristich 2013).

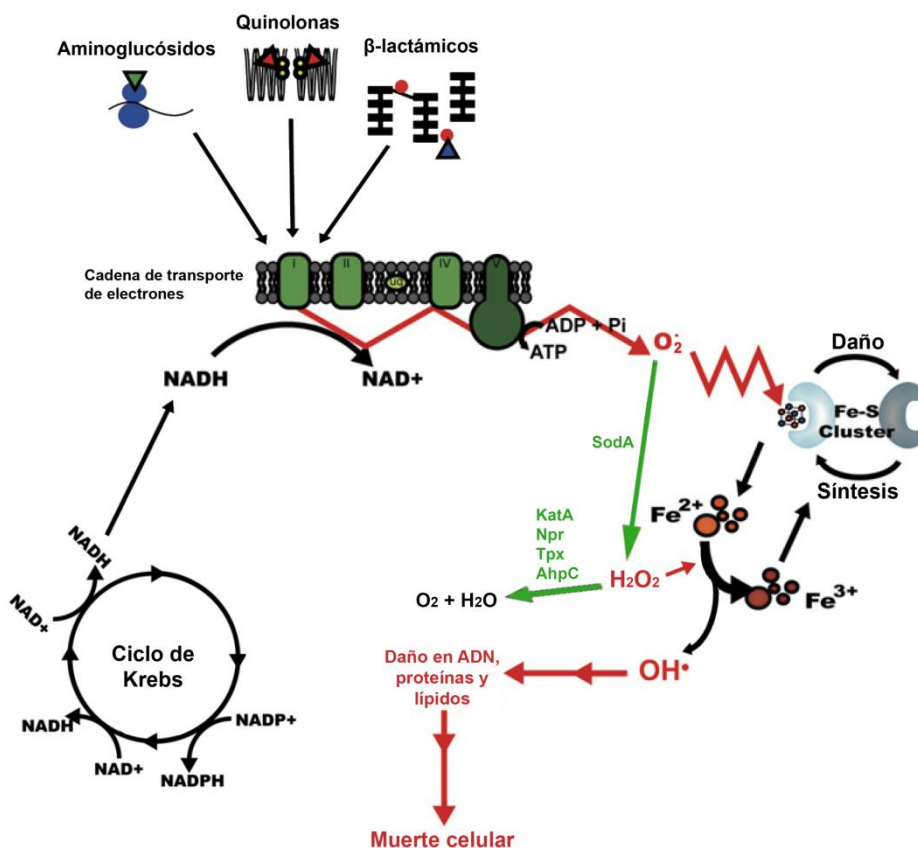


Figura 3. Letalidad de los antibióticos a través de un desequilibrio del estado oxidativo (rutas en rojo). Los agentes bactericidas aumentan la actividad de la primera etapa (señalada con línea discontinua) de la cadena de transporte de electrones, lo que conlleva una superproducción de ROS, que va a promover la reacción de Fenton y los daños en la célula que llevarán a la muerte de la misma. Las principales enzimas antioxidantes y sus rutas se indican en verde. Modificado de Kohanski *et al.* 2007.

El esquema anterior de defensa frente al estrés oxidativo se complica ante la presencia de otros reguladores, cuyo mecanismo no se comprende en su

totalidad a día de hoy. Aparte de HypR, ya comentado, cabe mencionar el papel de PerR (Verneuil *et al.* 2005) y Spx (EF2678), pues ambos presentan motivos CXXC. PerR se ha relacionado con la virulencia en *E. faecalis* y otros Firmicutes. Spx se encuentra influenciado por factores sigma y su activación induce la expresión, entre otros, de los genes *ahpC*, *perR* y *trfA* (habiéndose implicado este último gen con la resistencia a antibióticos en *S. aureus*) e inhibe a *npr*, *sodA* y *tpx*; además, la falta de *spx* produce una mayor susceptibilidad a diferentes antibióticos (Kajfasz *et al.* 2012; Jousselin *et al.* 2013).

1.3. Patogénesis y virulencia

Además de la inusual resistencia a condiciones adversas del medio y a multitud de antibióticos, *E. faecalis* y *E. faecium* cuentan con diferentes factores de patogenicidad y virulencia, los cuales han sido estudiados en mayor profundidad en el primero por ser el responsable clásico de las infecciones enterocócicas.

A diferencia de otros cocos cercanos, la mayoría de los enterococos no producen toxinas proinflamatorias destacadas. En cambio, sí que expresan proteínas de adhesión a tejidos del hospedador y otros factores, resumiéndose aquí solo los principales:

1.3.1. Determinantes de superficie

- Proteínas de sustancia de agregación (proteínas AS): contribuyen a la adhesión de la bacteria a células epiteliales renales, a la supervivencia en el interior de los neutrófilos, a la internalización en las células intestinales y a la formación de agregados bacterianos en la válvula cardíaca en cuadros de endocarditis. Están codificadas en plásmidos

conjugativos y su síntesis se ve estimulada por las “feromonas” liberadas por cepas carentes de plásmidos, favoreciéndose así por las proteínas AS una estrecha unión de ambas bacterias para la transferencia conjugativa de los plásmidos de respuesta a feromonas (Devriese *et al.* 2006).

- Proteína enterocócica de superficie: producida por *E. faecalis* (Esp_f) y *E. faecium* (Esp_{fm}). Existe una correlación entre la posesión del gen *esp* y la habilidad de *E. faecalis* para formar biofilms, así como con el nivel de persistencia en infecciones urinarias (Toledo-arana *et al.* 2001; Vergis *et al.* 2002).
- El polisacárido de ramnosa Epa (*enterococcal polysaccharide antigen*) y el polisacárido capsular (*capsular polysaccharide locus*) participan en la evasión de la respuesta inmune, la formación de biofilms y la translocación a través del enterocito (Arias & Murray 2012). Epa también se ha relacionado con la resistencia a ciertas cefalosporinas (Hoff & Kristich 2016).
- Componentes de superficie que reconocen moléculas de adhesión de la matriz extracelular del hospedador (*microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules*, MSCRAMMs). Destacan las adhesinas de colágeno, tales como Ace y Acm (Arias & Murray 2012) o el pilus Ebp (*Endocarditis and biofilm-associated pilus*), relacionados con una mayor capacidad de formación de biofilms (Tariq *et al.* 2012).

Aparte de Ebp, en *E. faecalis* solo se ha encontrado otro tipo de pilus, Bee (relacionado con biofilms), mientras que *E. faecium* presenta con frecuencia cuatro o más loci codificantes de pili (Arias & Murray 2012).

1.3.2. Factores de secreción

- Hemolisina-citolisina (Cyl): secretada en forma de dos subunidades estructurales, es capaz de lisar células de las series roja y blanca de diferentes especies (Vergis *et al.* 2002).
- Gelatinasa (también conocida como cocolisina) y serina-proteasa extracelular: los genes codificantes de estas proteasas conforman el operón *gelE-sprE*, controlado positivamente por el regulador *fsr*, cuya expresión se regula por un sistema de *quorum-sensing* (Sifri *et al.* 2002).

Por último, también cabe mencionar, como parte de los factores relacionados con la virulencia de *Enterococcus*, ciertas proteínas de respuesta al estrés, como Gls24 (que proporciona resistencia frente a las sales biliares) o las enzimas de respuesta frente al estrés oxidativo ya citadas anteriormente (Riboulet *et al.* 2007; Arias & Murray 2012).

1.4. Vías y factores implicados en la infección por *E. faecalis* y *E. faecium*

La infección por *Enterococcus* puede producirse por translocación desde el tracto digestivo o por entrada directa al torrente sanguíneo.

El primer paso para que se produzca una infección enterocócica a partir de la microbiota intestinal es la colonización masiva del tracto digestivo por la bacteria. Normalmente los enterococos comensales constituyen una proporción pequeña de la microbiota, pero determinadas situaciones pueden favorecer una disbiosis y un posterior sobrecrecimiento de estos. Esto ocurre, por ejemplo, si se altera la barrera epitelial intestinal o la fisiología digestiva (incluyendo el peristaltismo o la acidez

gástrica) o, especialmente, tras un tratamiento con antibióticos frente a los cuales los enterococos sean resistentes, como son las cefalosporinas, vancomicina y/o antibióticos con acción frente a los microorganismos anaerobios de la microbiota intestinal (Ubeda *et al.* 2010). Este sobrecrecimiento de los enterococos puede desembocar en la invasión del torrente sanguíneo (Ubeda *et al.* 2010). Su resistencia a condiciones adversas y sus diferentes factores de virulencia le permiten sobrevivir dentro de los macrófagos para poder así atravesar la barrera intestinal y diseminarse sistémicamente (Kajfasz *et al.* 2012).

Además, se sabe que la colonización del tracto gastrointestinal por una cepa multirresistente como es VRE puede mantenerse durante años antes de que desaparezca.

Anteriormente se creía que el principal origen de los enterococos en una infección era la propia microbiota del paciente a través del mecanismo ya descrito, pero desde que empezaron a destacar como patógenos nosocomiales se sabe que la transmisión intrahospitalaria es crítica (Arias & Murray 2012). Ya se ha comentado la resistencia que presentan los enterococos a las condiciones ambientales, y esto les permite resistir hasta cuatro meses (Kramer *et al.* 2006) sobre diversas superficies. En el ámbito hospitalario se encuentran contaminando el mobiliario, instrumental médico, los catéteres, sondas, etc., material a través del cual se puede producir la entrada directa de las bacterias al torrente sanguíneo por soluciones de continuidad (Figura 4). Además, la formación de biofilms en estos materiales proporciona un foco de infección desde el que habrá un flujo constante de bacterias al paciente. Este hecho enfatiza la necesidad de correctas medidas de higiene y desinfección en los ambientes clínicos.

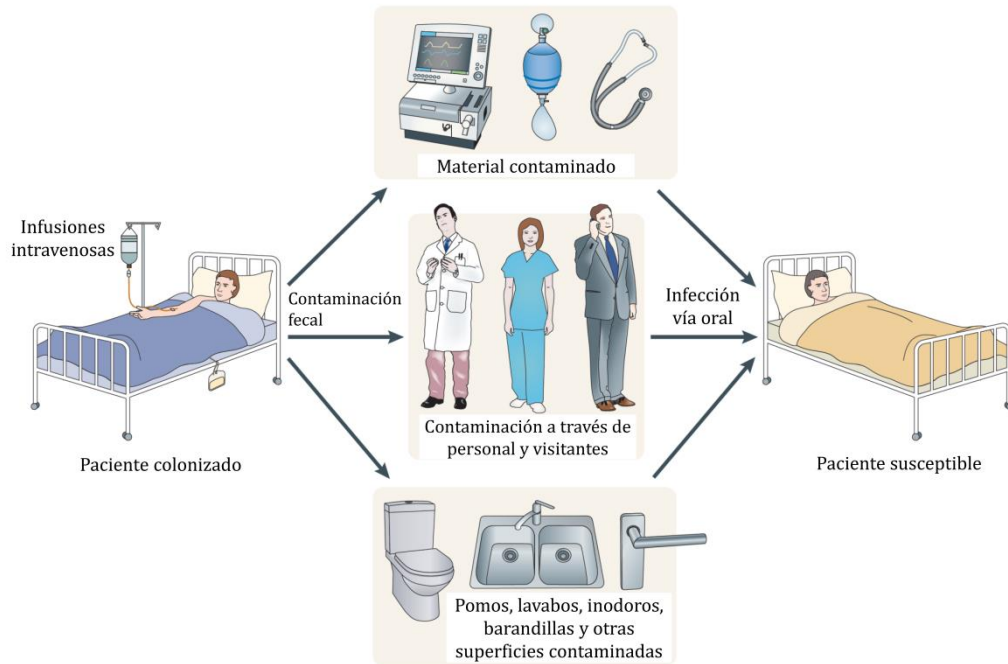


Figura 4. Diseminación de los enterococos en el ambiente intrahospitalario. Modificado de Arias & Murray 2012.

1.5. Resistencia a antibióticos y otros agentes

Aparte de sus particulares propiedades de resistencia al estrés, otra de las razones que ha llevado a que *E. faecalis* y *E. faecium* constituyan un serio problema en las infecciones hospitalarias de todo el mundo es su resistencia intrínseca a gran variedad de antibióticos, a lo que hay que añadir la facilidad con la que este género adquiere nuevas resistencias, especialmente la especie *E. faecium* (Rice *et al.* 2009). Además, los enterococos presentan un genoma de una enorme plasticidad (Paulsen *et al.* 2003), y varias especies de interés, como es la cepa clínica *E. faecalis* V583, carecen del sistema CRISPR-Cas, sospechándose que esto les permite acumular con mayor facilidad genes de resistencia y, no solo eso, sino que también promueve la diseminación de dichos genes a otras especies bacterianas (Werner *et al.* 2013).

1.5.1. Resistencia a glucopéptidos

En 1986 se describió la primera cepa de *E. faecium* resistente a glucopéptidos (teicoplanina y, más relevante, vancomicina). Esta resistencia está mediada por una serie de genes localizados en un transposón (Devriese *et al.* 2006). El mecanismo de resistencia reside en la sustitución de los péptidos normales del peptidoglicano D-Ala-D-Alanina (diana de los glucopéptidos; Figura 5) por D-Ala-D-Lactato o por D-Ala-D-Serina (Xu *et al.* 2010). A día de hoy están descritos 9 grupos de genes diferentes, los cuales se denominan por el tipo de ligasa encargada de la unión D-Ala con D-Lac o D-Ser. Los más frecuentes son VanA (cuyos genes se localizan en el transposón Tn1546) y VanB (en el transposón Tn1549) (Depardieu *et al.* 2015). La resistencia a vancomicina se ha visto con más frecuencia en *E. faecium* que en *E. faecalis* y, aunque a nivel global de la UE no ha aumentado significativamente en los últimos años, sí que se ha descrito una mayor proporción de VRE en 12 de los 26 países controlados (ECDC 2015).

Además, la emergencia de VRE tuvo otra consecuencia de gran repercusión clínica, la transmisión de dicha resistencia a *S. aureus* a través del transposón Tn1546 (Sievert *et al.* 2002). La aparición de aislados de alta resistencia a vancomicina, VRSA, supone una situación crítica para el tratamiento de las infecciones causadas por estas cepas de *S. aureus*. A día de hoy, afortunadamente, dichos aislados han sido descritos con muy poca frecuencia (Gardete & Tomasz 2014).

1.5.2. Resistencia a aminoglucósidos

Los enterococos poseen cierta resistencia intrínseca a aminoglucósidos, un grupo de antibióticos que inhibe la síntesis proteica al actuar sobre la subunidad 30S del ribosoma. Por ello, no deben ser utilizados como

monoterapia frente a infecciones enterocócicas. En cambio, estos antibióticos aumentan enormemente su eficacia en sinergia con otros cuya diana de acción sea la pared bacteriana, como son los β -lactámicos, por facilitar así la accesibilidad del aminoglucósido a su diana de acción (Walsh 2013). Sin embargo, hoy en día, la emergencia de resistencias de alto nivel frente a aminoglucósidos en los enterococos por adquisición de enzimas modificadoras ha limitado el uso de esta estrategia de ataque (Hollenbeck & Rice 2012). En la Unión Europea, entre un 25 y un 50% de los aislados descritos son altamente resistentes a gentamicina (ECDC 2015).

1.5.3. Resistencia a rifampicina y otros

La rifampicina, que se une a la subunidad β de la ARN polimerasa, inhibiéndola, no es un antibiótico que se utilice en general como agente único. Su uso frente a *Enterococcus* es infrecuente y la susceptibilidad de las cepas es variable (Enne *et al.* 2004). Uno de los mecanismos más frecuentes de adquisición de resistencias a rifampicina es por mutaciones en los genes *rpoB* y *rpoC*, codificantes para las subunidades β y β' de la ARN polimerasa, respectivamente (Ferrándiz *et al.* 2005; Lee *et al.* 2013; Du *et al.* 2014). Estas mutaciones aparecen de forma bastante frecuente tras una exposición a rifampicina. Sorprendentemente, hoy en día se sabe que mutaciones específicas en estos genes afectan también a la resistencia a cefalosporinas (Kristich & Little 2012).

Los enterococos también son intrínsecamente resistentes a la clindamicina y a la combinación sulfametoxazol-trimetoprim, por lo que estos antibióticos no deben ser usados para infecciones por enterococos, a pesar de que las

pruebas *in vitro* puedan sugerir lo contrario (CLSI 2017; EUCAST 2017)³. *E. faecalis* es intrínsecamente resistente a la combinación quinupristín-dalfopristín, pero no así *E. faecium* (Gilmore *et al.* 2014). Además, los enterococos también han sido capaces de adquirir resistencias contra otros agentes: eritromicina, cloranfenicol, linezolid, daptomicina, etc. (Arias, Murray 2012).

1.5.4. Resistencia a β -lactámicos: penicilinas y carbapenemas

La resistencia a β -lactámicos exhibida por los enterococos es la más relevante clínicamente. Esta familia incluye 4 grupos de antibióticos: las penicilinas, las cefalosporinas, las carbapenemas y los monobactámicos. Los antibióticos de esta amplia familia se unen a las enzimas encargadas de la síntesis de la pared bacteriana, llamadas PBPs (*penicillin binding proteins*), y actúan como sustratos suicidas para las mismas, impidiendo la correcta conformación de la pared y provocando, por tanto, la muerte bacteriana.

Las PBPs se dividen en dos grandes categorías: de alto peso molecular y de bajo peso molecular. Las primeras, a su vez, se clasifican en: clase A, si presentan actividad transglicosilasa (elongación de cadenas no entrecruzadas; también llamada glicosiltransferasa) y D,D-transpeptidasa (entrecruzamiento de cadenas adyacentes; también llamada carboxipeptidasa), o clase B si únicamente poseen actividad D,D-transpeptidasa (Sauvage *et al.* 2008). El entrecruzamiento entre cadenas adyacentes se produce gracias a dos L-Ala – L-Ala en *E. faecalis*, mientras que en *E. faecium* tiene lugar por un D-Asp o un D-Asn (Figura 5).

³ CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*; EUCAST: *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.

Por último, las PBPs de bajo peso molecular modifican el grado de entrecruzamiento de las cadenas peptídicas (Duez *et al.* 2004).

Los enterococos poseen en su genoma una PBP de clase B, la PBP4 (en *E. faecium*) o PBP5 (en *E. faecalis*), innecesaria para el crecimiento de la bacteria pero vital para su resistencia a los β -lactámicos, pues presenta una baja afinidad hacia estos (Sifaoui *et al.* 2001). Esto hace que esta familia de fármacos tenga una actividad muy variable frente a *Enterococcus*.

En general, antibióticos como la ampicilina y la penicilina se pueden utilizar con éxito frente a cepas sin mecanismos de resistencia adicionales. En muchas ocasiones, el efecto conseguido es solo bacteriostático y, por ello, en situaciones graves se recurre a una terapia combinada con aminoglucósidos (siempre que se trate de cepas sin alta resistencia a estos) para asegurar un efecto bactericida (Gilmore *et al.* 2014). Mutaciones en la PBP4/PBP5 también conducen a una pérdida de la actividad de las penicilinas. Esto ocurre principalmente en *E. faecium*, dado que la PBP de baja afinidad juega un papel más importante en esta especie (Arbeloa *et al.* 2004). La producción de β -lactamasas en *Enterococcus* es anecdótica (ECDC 2015).

Por otro lado, en los últimos años se ha caracterizado en *Enterococcus* y otras especies el papel de una enzima L,D-transpeptidasa (Figura 5). Esta, a diferencia de las D,D-transpeptidasas tradicionales (que crean puentes entre D-Ala⁴ de una cadena y L-Lys³ de la adyacente), es capaz de crear puentes Lys³ \rightarrow L-Lys³ (Mainardi *et al.* 2005). En *E. faecium*, los tetrapéptidos utilizados por la L,D-transpeptidasa (Ldt_{fm}) son producidos a partir de los pentapéptidos por la D,D-carboxipeptidasa DdcY (Sacco *et al.* 2014). En

cambio, la L,D-transpeptidasa de *E.faecalis* (Ldt_{fs}) es capaz de realizar su función utilizando tanto los pentapéptidos creados por las PBPs de clase A como tetrapéptidos.

Las L,D-transpeptidasas se han descrito en diferentes especies, pero, aparte de *Enterococcus*, solo se ha observado una función relevante en *Clostridium difficile* y *Mycobacterium*, especies en las que se ha visto que la forma predominante de entrecruzamiento en el peptidoglicano es precisamente el llevado a cabo por las L,D-transpeptidasas (Lecoq *et al.* 2014). Debido a su diferente estructura química, en la que destaca la presencia de cisteína en su centro activo en lugar de serina, son capaces de proporcionar alta resistencia a ampicilina incluso en ausencia de la PBP de baja afinidad (Mainardi *et al.* 2005). Sin embargo, las L,D-transpeptidasas sí pueden ser inactivadas por las carbapenemas (Dubée *et al.* 2012).

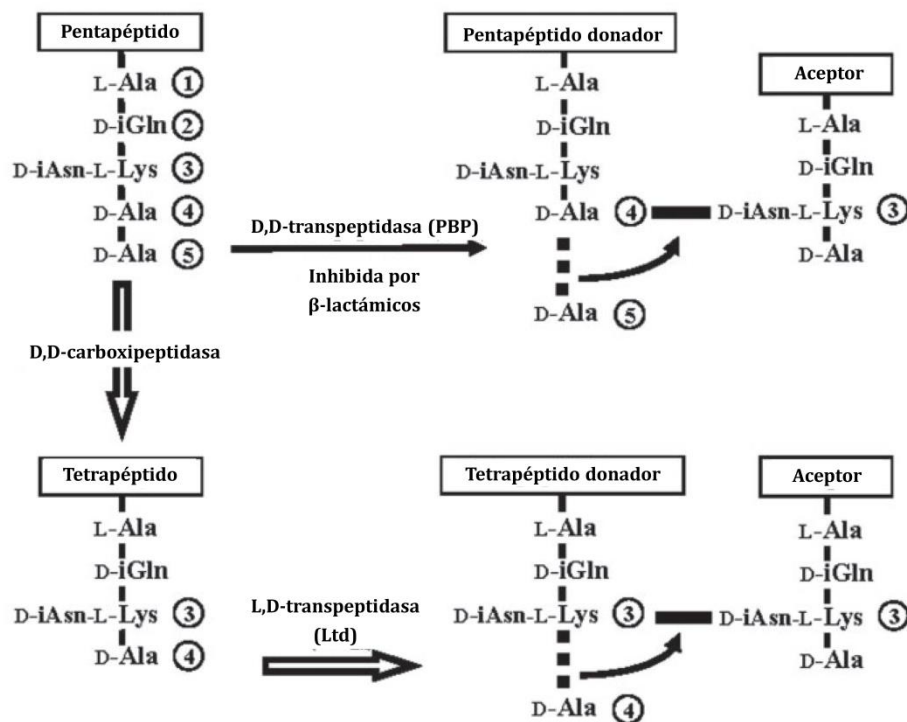


Figura 5. Actividad de la D,D-transpeptidasa (PBP) y de la L,D-transpeptidasa (Ldt_{fm}) en *E. faecium*. D-iAsn corresponde a D-Aspartato o D-Asparagina. La L,D-transpeptidasa de *E. faecalis* no requiere una conversión previa de pentapéptidos a tetrapéptidos. Modificado de Mainardi *et al.* 2005.

1.5.5. Resistencia a β -lactámicos: cefalosporinas

Las cefalosporinas son β -lactámicos desarrollados inicialmente a partir del hongo *Cephalosporium* (hoy en día denominado *Acremonium*) y comercializados a partir de los años 60. Las cefalosporinas inicialmente desarrolladas, denominadas de primera generación, eran principalmente activas frente a patógenos gram positivos. Las cefalosporinas desarrolladas posteriormente, por modificación de sus cadenas laterales, se denominan de segunda, tercera y cuarta generación. Presentan mayor espectro de acción, estabilidad y resistencia a β -lactamasas.

La consecuencia más importante de la presencia de la PBP de baja afinidad es la resistencia intrínseca que confiere a los enterococos frente a las cefalosporinas, pues es capaz de continuar la síntesis de la pared aunque el resto de las PBPs se encuentren saturadas con el antibiótico.

Aunque hasta hace relativamente poco tiempo se pensaba que dicha resistencia se debía exclusivamente a la presencia de dicha PBP en la pared celular, hoy en día se sabe que hay una serie de factores adicionales implicados y no se descarta la presencia de otros factores no identificados a día de hoy (Comenge *et al.* 2003; Kristich & Little 2012; Sifaoui *et al.* 2001; Vesic & Kristich 2012).

- La presencia y la actividad de PBP5/PBP4⁴ en la pared bacteriana es una particularidad de *Enterococcus* en comparación con otros Gram positivos. En otras especies, la inhibición de varias PBPs de un organismo parece impedir la construcción normal de la pared, aunque

⁴ Para simplificar, durante el resto de la tesis nos referiremos a la PBP de baja afinidad de *Enterococcus* como PBP5.

alguna PBP siga activa. En cambio, en esta especie, cuando las otras PBPs se encuentran saturadas de antibiótico, ella por sí sola es capaz de sintetizar la pared bacteriana anulando la eficacia del fármaco.

PBP5, aparte de ser fundamental en la resistencia a cefalosporinas, también confiere una resistencia moderada a ampicilina. Una mayor resistencia a esta penicilina se debe a una sobreproducción de la proteína, alteraciones aminoacídicas u otros factores no relacionados con PBP5 (Sifaoui *et al.* 2001).

- La delección de las PBPs de clase A conlleva la pérdida de la resistencia a β -lactámicos en *Enterococcus*. Esto tiene sentido dado que, como hemos visto, la PBP5 solo posee actividad transpeptidasa y, por tanto, requiere de una enzima con actividad transglicosilasa para poder sintetizar la pared. Por lo tanto, los fármacos solo inhibirían la actividad transpeptidasa de las PBPs de clase A mientras su actividad transglicosilasa permanece activa. Sin embargo, un mutante sin PBPs de clase A es viable en *Enterococcus*, lo que quiere decir que deben existir otras proteínas no descritas, estructuralmente diferentes de dichas PBPs, que tengan función transglicosilasa (Arbeloa *et al.* 2004; Rice *et al.* 2009). Además, en *E. faecium* se ha visto que la delección las PBPs de clase A afecta específicamente a la resistencia a determinadas cefalosporinas, pero no a otras (Rice *et al.* 2009).

Es decir, las PBPs de clase A son innecesarias para la polimerización de la pared, por la presencia de una enzima desconocida alternativa. No obstante, la actividad de dicha enzima no es suficiente para que la PBP5 pueda sintetizar del peptidoglicano en presencia de cefalosporinas.

- La proteína BppA2 se encarga de la síntesis de la segunda L-Alanina en los precursores del peptidoglicano y su delección provoca un ligero descenso en la resistencia a cefalosporinas (Bouhss *et al.* 2002).
- El sistema de regulación CroRS está formado por un sistema de dos componentes, con un regulador de respuesta (CroR) y una quinasa (CroS), que son cotranscritos de un promotor *croRp*, inducido por inhibidores de la síntesis de la pared.

A día de hoy, el sistema CroRS solo se ha relacionado con la regulación de tres genes: el propio *croRS*, el operón *gln* (encargado del transporte de glutamina) y la proteína secretada *salB*, relacionada con el estrés (Le Breton *et al.* 2007). Sin embargo, no se ha encontrado ninguna correlación entre estos genes y la resistencia a cefalosporinas. También se sabe que este sistema o los genes regulados por el mismo no afectan al entrecruzamiento durante la formación del peptidoglicano ni a la proporción de PBPs (Comenge *et al.* 2003). Pero sí se ha descrito que la alteración del sistema CroRS vuelve susceptibles a las bacterias incluso con una sobreproducción de PBP5 (Comenge *et al.* 2003).

- La quinasa IreK (de *Intrinsic Resistance of Enterococci*), perteneciente a la familia de las Ser/Thr proteín-quinasa, actúa en relación con la fosfatasa IreP, formando un sistema IreK-IreP que actúa antagonísticamente. La primera es necesaria para la resistencia a cefalosporinas por regular las respuestas adaptativas en situaciones de daño de la pared, pero su actividad en ausencia del fármaco produce un defecto de crecimiento, lo cual es evitado al ser defosforilada por IreP (Kristich *et al.* 2011). Aún no se conoce bien el modo de acción de este complejo, dado que el único

sustrato de IreK-IreP que se ha descrito es IreB, el cual actúa como regulador negativo de la resistencia a cefalosporinas (Hall *et al.* 2013).

- La enzima MurAA, que cataliza la síntesis del peptidoglicano en uno de los primeros pasos, es necesaria (pero no suficiente) para la resistencia específica a cefalosporinas (Vesic & Kristich 2012). MurAA transfiere un grupo enolpiruvil del fosfoenolpiruvato a la UDP-N-acetilglucosamina, la cual es transformada posteriormente por MurB a UDP-N-acetilmurámico. Es interesante señalar que muchas bacterias gram positivas, incluyendo *Enterococcus*, contienen dos tipos de esta enzima inicial MurA: la citada MurAA y su homóloga MurAB; sin embargo, solo se ha demostrado la implicación de MurAA en la resistencia a cefalosporinas. En dichos estudios, se observó que la resistencia de la pared de un mutante $\Delta murAA$ era menor en comparación con la bacteria *wild-type*. Además, se observó que una sobreexpresión del gen *murAA* podía compensar la falta de *ireK* (aunque no se ha encontrado la correlación entre ambos), pero no de *pbp5* o de *croR* (Vesic & Kristich 2012).
- Se ha comprobado que la interrupción de la vía de producción de timidina afecta específicamente a la resistencia a cefalosporinas de *E. faecalis* y *E. faecium*, pero no de otros enterococos o de otras especies cercanas. Esto se debe a una reducción de la síntesis de dTDP-glucosa (timidin difosfato glucosa), lo que conlleva una alteración de la producción del exopolisacárido de la pared Epa (Hoff & Kristich 2016).
- Ciertas alteraciones en la subunidad β de la ARN polimerasa pueden alterar la resistencia intrínseca a cefalosporinas, presuntamente por alterar la transcripción de genes relacionados con dicha resistencia. No

obstante, aún no se ha podido establecer una conexión directa con ninguno de los factores descritos (Kristich & Little 2012).

- Djoric y Kristich demostraron recientemente cómo la presencia de especies reactivas de oxígeno, H_2O_2 en particular, promueve la resistencia a cefalosporinas en *E. faecalis*, pues el daño que produce a la pared celular activa el sistema CroRS. Mostraron que al deletar el represor transcripcional *rex*, que posee una función *redox-sensing*, el mutante presentaba un fenotipo de hiperresistencia a cefalosporinas, y dicho fenotipo desaparecía en condiciones de anaerobiosis (Djorić & Kristich 2015). Sin embargo, esto choca con otro artículo que afirma que la interrupción de la NADH peroxidasa, encargada de descomponer el H_2O_2 (reduciendo por tanto el nivel de ROS) conlleva una pérdida de la resistencia a ceftriaxona en V583 (Rigottier-Gois *et al.* 2011).

Todas estas características tan singulares de *Enterococcus* encuentran parcialmente explicación en otra característica de este patógeno, el hecho de que más de un cuarto del genoma total de *E. faecalis* (en particular, la cepa V583) es móvil o de origen exógeno, constituyendo una de las mayores proporciones de elementos móviles observadas en el genoma de una bacteria (Paulsen *et al.* 2003). Este genoma incluye tres plásmidos, siete regiones codificantes de fagos, 38 elementos de inserción, varios transposones, una isla de patogenicidad putativa y varios genes de plásmidos integrados (como los plásmidos de respuesta a feromonas). Este hecho es parcialmente explicable si se tiene en cuenta que los enterococos multirresistentes (MDR) no poseen CRISPR (*Clustered, Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), un sistema de defensa procariota frente a la adquisición de material

genético exógeno presente en, aproximadamente, el 45% de los genomas bacterianos (Palmer & Gilmore 2010).

No hay que olvidar que las peculiaridades del genoma de los enterococos hacen de esta bacteria un perfecto reservorio de genes de resistencia, siendo responsables, como ya se ha citado, de la transmisión de la resistencia a vancomicina a MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*).

1.6. Relevancia clínica de *E. faecalis* y *E. faecium*

Desde los años 80, cuando empezaron a destacar como patógenos nosocomiales, hasta mediados de los años 90, prácticamente la totalidad de los casos clínicos por enterococos se debían a infecciones de *E. faecalis*. Sin embargo, desde entonces la incidencia de *E. faecium* ha aumentado espectacularmente, especialmente por aislados resistentes a la vancomicina (VRE) y ampicilina (Arias & Murray 2012). *E. faecalis* parece presentar una mayor capacidad innata para causar infecciones clínicas, mientras que *E. faecium* es más oportunista, aprovechando su resistencia a multitud de antibióticos de último recurso para proliferar tras un tratamiento antimicrobiano (Mundy *et al.* 2000). De hecho, *E. faecium* representa la mayor parte de los aislados VRE, razón por la que se suele hacer referencia a esta especie cuando se habla de patógenos de importancia crítica (Rice 2008). De hecho, muy recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido a *E. faecium* resistente a vancomicina entre los 12 patógenos para los que resulta prioritario encontrar nuevos tratamientos antimicrobianos (Tacconelli *et al.* 2017) (Tabla 1).

Esporádicamente, otras especies se han identificado como responsables de infecciones en humanos. De todas ellas, despiertan mayor interés las infecciones por *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*, dado que son intrínsecamente resistentes a

vancomicina, uno de los antibióticos utilizados como último recurso para las infecciones enterocócicas (Gilmore *et al.* 2014).

Las patologías más frecuentemente producidas por enterococos son las del tracto urinario inferior en ancianos, siendo también en este grupo en el que es más posible que aparezcan complicaciones, tales como infecciones del tracto urinario superior y bacteriemia (Gilmore *et al.* 2014). Como, además, estas infecciones suelen contraerse en instalaciones hospitalarias, es frecuente que las cepas implicadas presenten multirresistencia a antibióticos. De hecho, VRE es uno de los principales responsables de las infecciones urinarias en pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos (Weiner *et al.* 2016).

Además, los enterococos se encuentran entre las primeras causas de bacteriemia en hospitales (Hollenbeck & Rice 2012), presentando una tasa de mortalidad de entre el 26 y el 46%, la cual se puede disparar hasta el 75% si se producen en pacientes con situaciones clínicas previas graves, tales como diabetes mellitus, cardiopatías, trasplantes, etc. (Gilmore *et al.* 2014).

La mayor complicación que se puede derivar de una bacteriemia por enterococos es la endocarditis. *Enterococcus* es responsable de hasta el 15% de las endocarditis de origen infeccioso, siendo causada por *E. faecalis* en mayor proporción que por *E. faecium* (Gilmore *et al.* 2014). Suelen producirse infecciones subagudas, con fallo cardiaco, y es más frecuente que afecten al lado izquierdo que al derecho. La endocarditis puede resultar más problemática de tratar que la propia bacteriemia, pues para que el tratamiento tenga éxito es necesario el uso de dos antibióticos con efecto sinérgico. Por tanto, en cepas multirresistentes, muchas veces es necesario recurrir a cirugía para poder eliminar la infección (Gilmore *et al.* 2014).

Tabla 1. Especies consideradas por la OMS de prioridad máxima en la búsqueda de nuevos antibióticos para combatirlos.

Prioridad 1: Crítica	Resistencias de especial relevancia
<i>Acinetobacter baumannii</i>	carbapenemas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	carbapenemas
<i>Enterobacteriaceae</i>	carbapenemas, cefalosporinas de 3ª generación
Prioridad 2: Elevada	
<i>Enterococcus faecium</i>	vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	meticilina, vancomicina (intermedio y resistente)
<i>Helicobacter pylori</i>	claritromicina
<i>Campylobacter</i>	fluoroquinolonas
<i>Salmonella</i> spp.	fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	fluoroquinolonas, cefalosporinas de 3ª generación
Prioridad 3: Media	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	no-susceptible a penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	ampicilina
<i>Shigella</i> spp.	fluoroquinolonas
<p>El género <i>Mycobacterium</i> cuenta con su propio plan de acción y, por tanto, no se incluye en la siguiente lista. La familia <i>Enterobacteriaceae</i> incluye <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Proteus</i> spp., and <i>Providencia</i> spp, <i>Morganella</i> spp.</p>	

Enterococcus también puede aislarse en infecciones intra-abdominales, pélvicas y neonatales, creándose cierta confusión en ocasiones sobre si es responsable de la infección o no. Sin embargo, sí es cierto que en casos de septicemia por enterococos es frecuente la aparición de abscesos a nivel pélvico e intra-abdominal, por lo que se suelen tener en cuenta a la hora de instaurar un tratamiento antibiótico en pacientes con infecciones de estas áreas. También pueden ocasionar, aunque no muy frecuentemente, peritonitis, normalmente asociadas a casos de cirrosis u otras patologías crónicas (Gilmore *et al.* 2014).

II. El ácido sulfhídrico

Desde principios del siglo XVIII existen escritos que sospechaban de algún tipo de compuesto volátil presente en el medio ambiente que sería responsable de casos de intoxicación y de la corrosión de diferentes materiales. Así, el descubrimiento del ácido sulfhídrico, cuya fórmula química es H_2S , se atribuye al químico sueco Carl Wilhelm Scheele en 1777. Al tratar sulfuro ferroso (comúnmente llamado pirita) con un ácido mineral, describió el gas sulfuroso que se desprendía y, sobre todo, su olor fétido, que hoy conocemos como “de huevos podridos”. Scheele también descubrió el cianuro (de hidrógeno, o ácido cianhídrico), el cual, como veremos más adelante, comparte varias propiedades con el ácido sulfhídrico, así como múltiples metabolitos de los microorganismos (Ljungdahl *et al.* 2003).

Durante más de dos siglos, la ciencia se centró (no sin razón) en el efecto tóxico y letal del ácido sulfhídrico. Se encuentra ampliamente distribuido en la Naturaleza, estando presente en materia en descomposición, en aguas estancadas, en zonas mineras y de aguas termales y en áreas volcánicas. Esto ha hecho que a lo largo de la Historia haya y siga habiendo situaciones de exposición del ser humano al H_2S .

El H_2S es un gas más pesado que el aire que se acumula en zonas bajas poco ventiladas (Hughes *et al.* 2009). Es tóxico por vía respiratoria. Molecularmente, al igual que el cianuro, bloquea la citocromo C oxidasa, inhibiendo la cadena respiratoria celular (Cooper & Brown 2008). A bajas concentraciones (100-300 partes por millón, ppm) produce irritación ocular y de las vías respiratorias. A altas concentraciones (300-700 ppm), bloquea el sistema respiratorio, pudiendo ser fatal en pocos minutos. Es por ello que a día de hoy las concentraciones de H_2S presentes

en lugares de trabajo están reguladas⁵. También hay que mencionar que el umbral olfativo de detección del H₂S (0.01-25 ppm) es entre 100 y 400 veces menor que el umbral tóxico (Wang 2002; Hughes *et al.* 2009), aunque a altas concentraciones o tras exposiciones de varios minutos uno de los primeros síntomas manifestados es, precisamente, la desaparición de la capacidad olfativa (Hughes *et al.* 2009).

Sin embargo, la relevancia del H₂S para esta tesis reside en que, desde hace 30 años aproximadamente, empezaron a estudiarse los efectos fisiológicos del H₂S, tras conocerse el papel que otros compuestos gaseosos desempeñaban en el metabolismo celular.

2.1. Evolución del estudio de los gasotransmisores: óxido nítrico, monóxido de carbono, ácido sulfhídrico

El término “gasotransmisor” fue acuñado por Wang para diferenciar a estos gases de los mensajeros celulares clásicos. Hoy, existen una serie de propiedades que dichos gases deben poseer para ser clasificados como tal (Wang 2002; Scuffi *et al.* 2016):

- Son capaces de atravesar libremente las membranas celulares sin necesidad de hacerlo a través de un transportador específico
- Son generados endógena y enzimáticamente, de forma regulada
- Presentan dianas de acción específicas en las células, ya sean sus efectos mediados por mensajeros secundarios o no
- Poseen funciones específicas y bien definidas a concentraciones fisiológicas
- Sus funciones pueden ser mimetizadas mediante la aplicación exógena de un donador del compuesto gasotransmisor

⁵ www.osha.gov/SLTC/hydrogensulfide/index.html

Suelen ser moléculas con una alta solubilidad lipídica y con una vida media muy corta, de apenas minutos o incluso segundos. Además, los tres principales gasotransmisores conocidos (NO, CO, H₂S) presentan una alta afinidad por la hemoglobina por el grupo hemo presente en la misma, como veremos más adelante.

El primer gas estudiado por su papel como mensajero celular fue el óxido nítrico (NO), cuya función principal parece tener lugar en el sistema cardiovascular (Furchgott & Zawadzki 1980). Inicialmente denominado EDRF (*Endothelium-Derived Relaxing Factor*) (Furchgott 1999), hizo falta cierto tiempo para dilucidar que era un gas el responsable de los efectos observados.

El óxido nítrico es producido por las óxido nítrico-sintasas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS). Su diana principal es el grupo hemo de la enzima soluble guanilato ciclasa (sGC), con lo que se produce un aumento de los niveles de GMPc que induce la vasodilatación al actuar como factor hiperpolarizante del endotelio, además de tener un efecto protector sobre este, por lo que se ha sugerido el potencial terapéutico del NO y el resto de los gasotransmisores contra la hipertensión (Yang *et al.* 2008). Los estudios sobre el óxido nítrico fueron recompensados con el Premio Nobel para Furchgott, Ignarro y Murad en 1998.

Al NO le siguió el monóxido de carbono (CO) (Marks *et al.* 1991; Ryter *et al.* 2004), con algunas propiedades muy similares, aunque el NO es producido principalmente por el endotelio y en el caso del CO son las células musculares lisas las principales encargadas de su síntesis. Posteriormente, se incluyó entre los gasotransmisores al H₂S, que fue propuesto como tal precisamente por Wang; otros gases como el dióxido de azufre (SO₂) se han estudiado en menor medida.

La primera evidencia del papel fisiológico del H₂S fue su detección en tejidos cerebrales de diferentes especies, identificándose poco después las enzimas

responsables de su producción en Eucariotas (Wang 2002). Dichas enzimas son, principalmente, cistationina beta-sintasa (CBS), cistationina gamma-liasa (CSE) y 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa (3MST). Estas enzimas se encuentran selectivamente en diferentes tipos de células (Kabil *et al.* 2014).

Posteriormente, el H₂S se ha relacionado con la apertura de los canales K_{ATP} en el sistema circulatorio (Li & Lancaster 2013), con un papel protector en el envejecimiento celular (Zhao *et al.* 2014), con un aumento de la vida media en *C. elegans* (Miller & Roth 2007) y también se ha demostrado su participación y la de otros gasotransmisores en el sistema endocrino o en el desarrollo embrionario de los animales. Incluso se ha demostrado que la exposición de ratones a bajas dosis de H₂S les induce un estado de “animación suspendida” o “hibernación” y que además les protege de la hipoxia (Blackstone *et al.* 2005), por lo que hoy en día está siendo estudiada su utilidad biomédica y su papel en la hibernación fisiológica de ciertos animales (Revsbech *et al.* 2014).

Tabla 2. Principales propiedades físico-químicas del oxígeno y de los tres gasotransmisores básicos. Modificado de Tinajero-Trejo *et al.* 2013.

	Oxígeno (O ₂)	Monóxido de carbono (CO)	Óxido nítrico (NO)	Ácido sulfhídrico (H ₂ S)*
Masa molar (g/mol)	32	28	30	34
Peso molecular (picometros)	121	113	115	134
Importancia del metabolismo <i>redox</i> en su biología	+++	+	++ (el radical)	++
Afinidad por hemo	Sí	Sí	Sí	Sí
Unión a metales	+++	+++	+++	+++
Principales mecanismos de síntesis endógena	Catalasa, fotosíntesis	Hemo-oxigenasas	NO sintasas, respiración de nitrato/nitrito	CBS/CSE/MST, reducción de sulfato
Función en bacterias	Oxidante biológico, cosustrato	Fuente de energía y de carbono	Intermediario en la desnitrificación, resistencia a antibióticos	Intermediario metabólico, resistencia a antibióticos

*: biológicamente, HS⁻ es la especie relevante (pK_a 6,8)

Sin embargo, el estudio de los gasotransmisores aún requiere de mucho estudio, pues existe mucha controversia sobre su bioquímica (Tabla 2), sus mecanismos de acción (Figura 6) o sobre sus efectos sobre el organismo. Por ejemplo, los primeros artículos hablaban de concentraciones plasmáticas en un rango micromolar, lo cual fisiológicamente no sería viable, como se ha visto posteriormente (Ono *et al.* 2014).

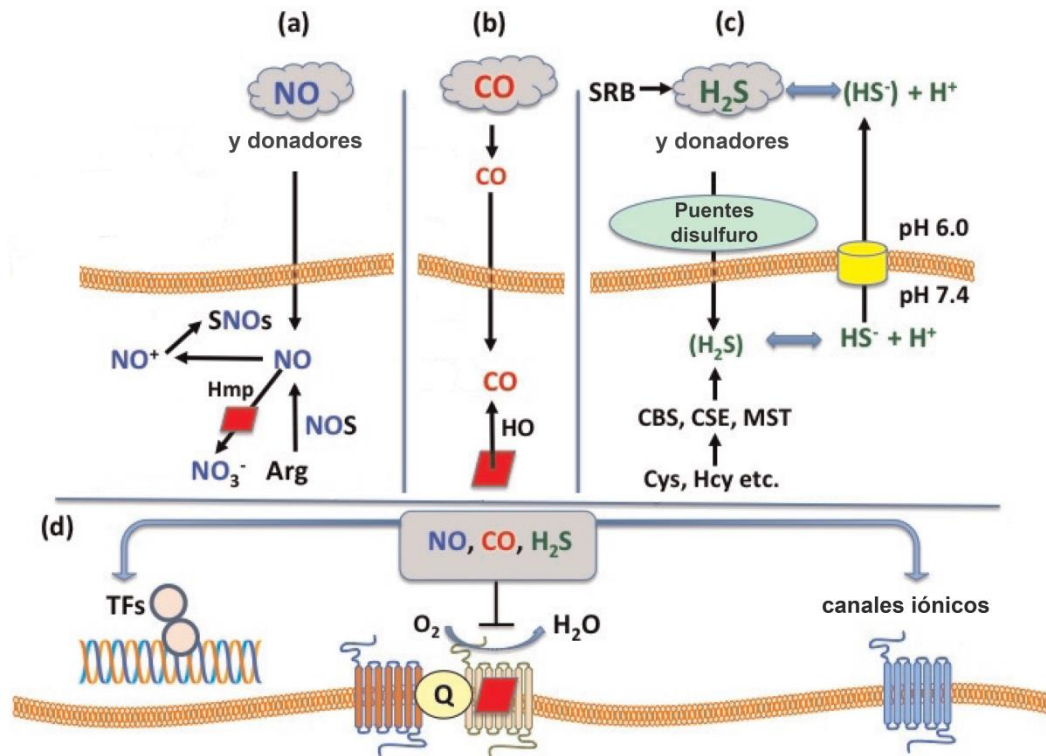


Figura 6. Principales vías de acción de NO, CO y H₂S. Los tres gases pueden atravesar las membranas libremente para acceder al interior celular, aunque sus donadores pueden requerir de transportadores específicos (no mostrado). Modificado de Tinajero-Trejo *et al.* 2013.

A. NO también puede ser generado intracelularmente por las NO sintasas, a partir de arginina, o por reducción de nitrito (no mostrado). El radical NO participa en diferentes reacciones, siendo la más importante la formación de S-nitrosotioles (SNOs). La ruta de detoxificación de NO mejor definida es la dioxigenación o denitrosilación catalizada por la flavohemoglobina Hmp.

B. CO también puede ser generado por algunas bacterias a partir de hemo-oxigenasas (HO) a partir del grupo hemo (rombos rojos).

C. El ión HS⁻, forma predominante intracelularmente por razones de pH, es excretado por un transportador específico. Internamente, diferentes rutas sintetizan H₂S (CBS, CSE, MST). SRB: Bacterias reductoras de sulfato.

D. Los gasotransmisores actúan sobre dianas específicas, bien factores de transcripción (TFs), bien uniéndose al grupo hemo de oxidasas terminales (inhibiendo la cadena respiratoria) o bien por modulación del transporte de iones. Q: quinonas implicadas en la respiración.

Por otro lado, existen artículos que confirman tanto el papel estimulador del crecimiento e inhibidor de la apoptosis, como artículos que afirman lo contrario (Baskar & Bian 2011). Incluso existen indicios de que el agente final puede no ser H₂S, sino otra molécula de azufre derivada (Toohey 2011; Ono *et al.* 2014).

En cualquier caso, la extensa bibliografía sobre el tema, junto con los estudios realizados en bacterias y los llevados a cabo en plantas, en los que se ha definido la regulación de los estomas por los gasotransmisores (Scuffi *et al.* 2014), o cómo el H₂S previene la oxidación de las uvas (Ni *et al.* 2016), sugieren que los gasotransmisores podrían ser moléculas señalizadoras universales.

2.2. Bioquímica y biología del H₂S

Desde un punto de vista químico, el compuesto H₂S es un hidrácido, es decir, un ácido que no contiene oxígeno y está formado por hidrógeno y un elemento no metálico. Por tanto, se denominaría sulfuro de hidrógeno (*hydrogen sulfide* en inglés, siendo este su nombre más conocido). Químicamente, la nomenclatura “ácido – hídrico” se reserva para las situaciones en las que el compuesto se encuentra en solución acuosa [incluyéndose el apéndice “(aq)” tras el nombre, a modo de aclaración].

Precisamente, las propiedades bioquímicas del ácido sulfhídrico en solución son las que marcan una diferencia importante entre este y el resto de los gasotransmisores, pues el H₂S puede encontrarse en diferentes formas iónicas. En solución, el compuesto H₂S se encuentra en equilibrio con los aniones derivados hidrogenosulfuro/bisulfuro (HS⁻) y sulfuro (S⁻²), como se observa en la

Figura 7. El H_2S es un ácido débil y su pK_a es 6.76 (a una temperatura de 37 °C), mientras que el pK_a de HS^- es mayor de 14. Por tanto, a pH fisiológico, la proporción $\text{HS}^-:\text{H}_2\text{S}$ va a ser aproximadamente de 3:1 (Hughes *et al.* 2009; Kabil & Banerjee 2010), teniendo el anión S^{2-} muy poca importancia en la bioquímica del H_2S .

Las soluciones acuosas de H_2S poseen un pH ligeramente ácido, presentando una solución saturada de H_2S una concentración 0.11 Molar y un pH de 4.0 (Hughes *et al.* 2009). Sin embargo, hay que tener en cuenta que, si no se toman las medidas adecuadas, el H_2S reaccionará con los posibles metales presentes en la solución y con el oxígeno, además de que la fuerte volatilidad del H_2S va a conllevar el desplazamiento del equilibrio a medida que el compuesto en estado gaseoso escapa de la solución (Li & Lancaster 2013). Esto, además, es el responsable de la corta vida media del ácido sulfhídrico en solución y debe tenerse en cuenta en el diseño experimental, puesto que probablemente es una de las razones por las que los diferentes estudios publicados muestran concentraciones de H_2S muy dispares entre sí (Li & Lancaster 2013).

A lo largo de esta tesis, y siguiendo la terminología internacional aceptada, vamos a emplear los términos “ácido sulfhídrico”, “*hydrogen sulfide*” y “ H_2S ” para referirnos tanto al compuesto H_2S en sí como a sus iones derivados, tanto en estado gaseoso como en solución.

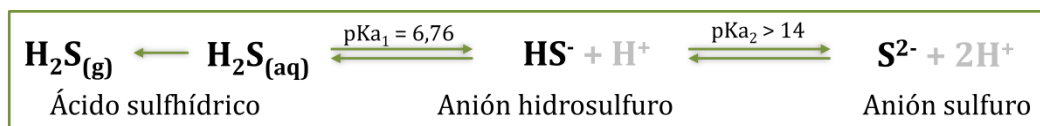


Figura 7. Equilibrio del H_2S a una temperatura cercana a 37 °C.

Dentro de la extensa regulación que debe controlar las acciones del H_2S , se incluye su almacenamiento intracelular y su eliminación. Las células presentan reservas de

H₂S tanto a través de los centros hierro-azufre (FeS) (Hughes *et al.* 2009) como a través del llamado sulfuro-sulfano⁶, en el que la forma sin carga del azufre (S⁰) se encuentra incorporada a proteínas a través de otros átomos de azufre (Figura 8). La forma química S⁰ no se encuentra nunca en estado libre (Paul & Snyder 2012a; Li & Lancaster 2013).

Los organismos cuentan con el sistema de la tiorredoxina (Trx) – Trx-reductasa, ya mencionado en los sistemas de defensa frente al estrés oxidativo. Por este mecanismo se puede eliminar el residuo de H₂S unido a una proteína, reduciendo los persulfuros al tiol nativo y liberando H₂S de nuevo al medio (Wedmann *et al.* 2016). Este sistema también es capaz de llevar a cabo la desnitrosilación de cisteínas y se encarga de regular las reservas de sulfuro-sulfano. Es importante señalar que un inhibidor selectivo de la Trx-reductasa es la auranofina, una molécula cuyo efecto antimicrobiano está demostrado (Harbut *et al.* 2015; Thangamani *et al.* 2016).

2.2.1. Vías de acción del H₂S

- Interacción con iones metálicos: tanto los otros dos gasotransmisores mencionados, NO y CO, como otras moléculas químicas de gran interés, incluyendo O₂, cumplen su función a través de metaloproteínas (Kabil *et al.* 2014; Ono *et al.* 2014). El principal metal con el que se ha relacionado a los gasotransmisores es el hierro, especialmente a través del grupo hemo presente en las proteínas. Esto es lo que ocurre con la guanilato ciclasa, con la hemoglobina o con la citocromo-c-oxidasa (a través de la cual estos gases resultan tóxicos por secuestrar el complejo IV de la cadena respiratoria). El H₂S también forma con el hierro los complejos

⁶ De acuerdo con la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), el término “sulfano” designa precisamente a la molécula H₂S. Sin embargo, por la escasa aplicación de esta terminología, por motivos de concordancia con la bibliografía y para facilitar la comprensión de esta tesis, emplearemos los términos utilizados clásicamente en este campo.

FeS, utilizados para almacenaje y homeostasis del hierro, como sensores *redox* y para la transferencia de electrones.

- Interacción con las especies reactivas de oxígeno: tanto en células eucariotas (Li & Lancaster 2013) como en procariotas (Shatalin *et al.* 2011) se ha descrito el papel antioxidante que tiene el H₂S, al ser una molécula reductora. Sin embargo, parece que las reacciones necesitarían de la presencia de iones metálicos que actúen como catalizadores, dado el bajo poder reductor que presenta el H₂S, siendo despreciable la reacción con O₂ bajo condiciones controladas (Li & Lancaster 2013). Por otro lado, la propia función bloqueadora del H₂S sobre la citocromo-c-oxidasa reduce la producción de ROS, lo que contribuiría al papel antioxidante del H₂S (Kabil *et al.* 2014).
- Interacción con óxido nítrico: dada la variedad de derivados químicos que forman tanto el H₂S como el NO, existen múltiples reacciones químicas en las que ambos podrían reaccionar entre sí. Sin embargo, la más conocida es la que tiene lugar entre el H₂S y los S-nitrosotioles, es decir, residuos de cisteína que han sido modificados por NO (formándose R-SNO). La reacción con H₂S revertiría el residuo tiol a su estado nativo (Li & Lancaster 2013), produciéndose HSNO que puede difundir libremente a través de las membranas y transnitrosilar proteínas alejadas (Kabil *et al.* 2014). Presuntamente, a partir del S-nitrosotiol también podría formarse un persulfuro y que el compuesto liberado fuera HNO.
- Interacción con los puentes disulfuro: existen estudios que afirman que el H₂S puede actuar tanto formando como rompiendo los puentes disulfuro (-S-S-) establecidos entre dos cisteínas (Hourihan *et al.* 2013;

Paulsen & Carroll 2013). Sin embargo, desde un punto de vista químico, el H₂S no tiene capacidad oxidante y existen discrepancias sobre si tiene suficiente potencial reductor para romper dichas uniones (Mustafa *et al.* 2009; Hourihan *et al.* 2013; Paul & Snyder 2012a; Toohey 2012; Paul & Snyder 2012b; Zhang *et al.* 2014; Ono *et al.* 2014).

- Interacción con las cisteínas: hoy en día se sabe que las modificaciones postraduccionales oxidativas de las proteínas, especialmente de sus residuos de cisteína, tienen un papel muy importante en la regulación de la fisiología celular (Chung *et al.* 2013; Wedmann *et al.* 2016), denominándose *redox switches* (interruptores redox). La cisteína es el único aminoácido cuya cadena lateral presenta un grupo tiol (-SH). El único otro aminoácido que contiene azufre en su estructura es la metionina, pero su localización hace que sea inaccesible para ser modificado de la misma manera que la cisteína (Figura 8).

No todas las cisteínas pueden ser modificadas a nivel postraducciona. En primer lugar, pueden encontrarse como puentes disulfuro (-S-S) contribuyendo a la arquitectura de la proteína. Por otro lado, dentro de aquellos residuos libres, la propia estructura proteica va a determinar la accesibilidad de las cisteínas. Por último, la reactividad del grupo tiol va a depender de su pKa, el cual va a estar influenciado por el pH del medio (el interior celular suele ser un ambiente reductor, pero en situaciones de estrés oxidativo se produce un descenso del pH) o por el entorno aminoacídico a su alrededor, entre otros (Paul & Snyder 2012a; Williams *et al.* 2015). Las cisteínas con un bajo pKa se encontrarán en forma aniónica (R-S⁻) y esto les va a conferir un fuerte comportamiento nucleófilo y una alta reactividad (Paul & Snyder 2012a).

Las cisteínas pueden reaccionar⁷, de forma reversible, con las especies reactivas de oxígeno (ROS), de nitrógeno (especialmente NO) y de azufre (especialmente H₂S). Las modificaciones por H₂S presentan una particularidad muy importante: su reacción con residuos de cisteína puede tanto reducir como incrementar la reactividad de las mismas, a diferencia de la nitrosilación, cuyo efecto es inhibitorio (Paul & Snyder 2012a).

Dentro de las posibles transformaciones que pueden sufrir las cisteínas (Figura 8), vamos a destacar:

- a) Tiolación: es la formación de la base conjugada del tiol con un metal (Paulsen & Carroll 2013). No suelen encontrarse como tal, pues precisamente los grupos tiolatos tienen una reactividad mucho mayor que su tiol original.
- b) Oxidación: en células tanto eucariotas como procariotas (Botello-Morte *et al.* 2014) existen motivos CXXC (siendo X un aminoácido), que actúan como reguladores redox y son la base de diferentes enzimas oxidoreductasas (como la tioredoxina reductasa). En presencia de un agente oxidante, los grupos tioles libres se oxidan formando un puente disulfuro entre ambas cisteínas. Esto produce un cambio conformacional de la proteína que puede activar o reprimir la enzima o la transcripción de otros genes. Asimismo, existen mecanismos para revertir ese puente disulfuro y que estos interruptores sean reversibles.

⁷ Las cisteínas también pueden ser modificadas por fosforilación, metilación, ubiquitinación, etc., (Shannon & Weerapana 2014) pero no son el objeto de estudio de esta tesis.

- c) S-Nitrosilación: el óxido nítrico puede ejercer una función reguladora sobre las cisteínas transformando el grupo -SH a -SNO, como vimos anteriormente.
- d) Sulfenilación: es una reacción reversible con ROS que da lugar al grupo R-SOH. La relevancia de esta reacción es que, por la inestabilidad del compuesto, es la base de sucesivas reacciones, como la persulfidación (Paulsen & Carroll 2013).

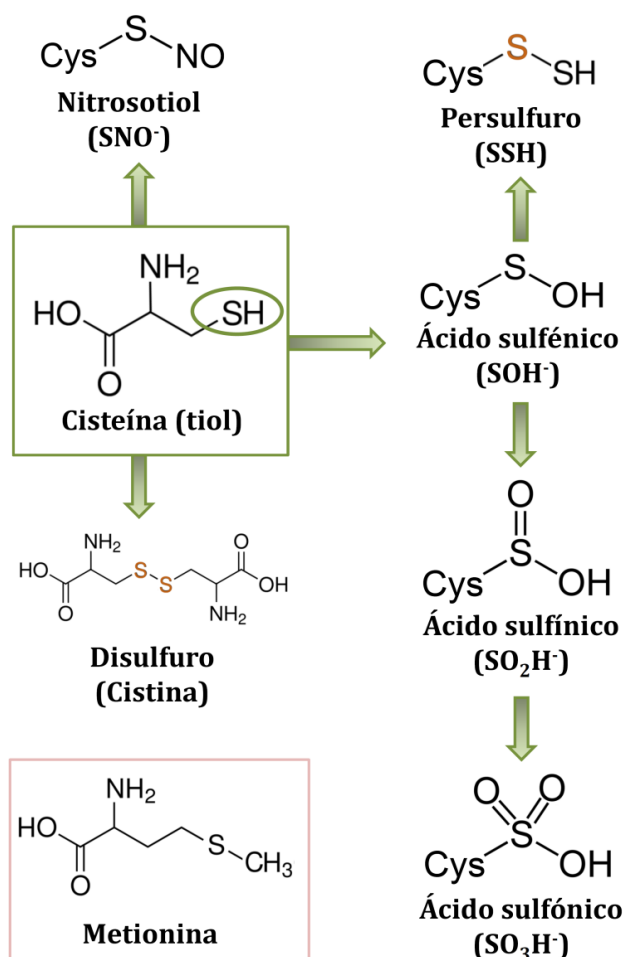


Figura 8. Estructuras químicas de la metionina, cisteína y los diferentes estados en los que puede encontrarse esta última, según la reacción que tenga lugar con el grupo tiol (rodeado en verde). Los átomos de azufre presentes en forma de sulfuro-sulfano se encuentran en naranja.

- e) Sulfinilación y sulfonilación: son reacciones con ROS a estados oxidativos irreversibles, dando lugar a R-SO₂H y R-SO₃H, respectivamente (Paulsen & Carroll 2013).
- f) Persulfidación: también llamada S-sulfhidración (o S-sulfhidratación⁸) (Mustafa *et al.* 2009). Existen varias teorías acerca de cómo se produce. La teoría más extendida es que el H₂S no tiene capacidad para reaccionar directamente con los tioles (Wedmann *et al.* 2014), por lo que la cisteína necesitaría inicialmente una sulfinilación por parte de moléculas reactivas de oxígeno (como podría ser H₂O₂). Posteriormente, se produciría la persulfidación en sí. Es la reacción del H₂S más descrita y la considerada de mayor relevancia funcional (Kabil *et al.* 2014), pues los persulfuros presentan en general un pKa menor y una mayor reactividad que sus correspondientes tioles. Además, también se ha sugerido que el H₂S puede tener un efecto protector antioxidante al sulfhidrilar las cisteínas, pues el persulfuro (al igual que el ácido sulfénico) es un estado reversible; en su ausencia, en casos de estrés oxidativo el ácido sulfénico podría seguir oxidándose a otros estados irreversibles que tendrían consecuencias fatales para la proteína (Paul & Snyder 2015).
- Otras vías de acción: no es descartable que existan otros mecanismos de acción del H₂S que aún no se hayan descrito, pues, como afirman algunos

⁸ De acuerdo con la IUPAC, el término sulfhidratación no es correcto porque debería involucrar la introducción de una molécula de agua en la reacción. Lo mismo ocurre con el término sulfhidrilación, que debería introducir un grupo SH que, en este caso, ya está presente en la molécula. Es por ello que el término correcto sería sulfuración (Toohey 2012). Sin embargo, los diferentes términos gozan hoy en día de una gran aceptación por parte de la comunidad científica (Paul & Snyder 2012b).

autores, “nuestro conocimiento sobre la producción y regulación del H₂S se encuentra todavía en la infancia” (Paulsen & Carroll 2013).

2.2.2. Herramientas para la detección del efecto del H₂S

El primer inconveniente para detectar los efectos producidos, tanto por H₂S como por otros gasotransmisores, es, como ya se ha comentado, la falta de conocimientos definitivos sobre el mecanismo de acción de este compuesto y sus dianas concretas.

Asumiendo, como se cree mayoritariamente, que el H₂S reacciona con residuos específicos de cisteína formando persulfuros (-SSH), a día de hoy, las herramientas desarrolladas consisten en marcar con moléculas fluorescentes los residuos afectados.

La dificultad inicial en el desarrollo de estas sondas es la reactividad similar que presentan los grupos tiol sin reaccionar (-SH) y los persulfuros (-SSH) (Zhang *et al.* 2014; Park *et al.* 2015).

Así, uno de los métodos más usados para la identificación de los tioles afectados es la técnica llamada “*biotin switch assay*” (Jaffrey & Snyder 2001). Esta consiste básicamente en marcar específicamente las cisteínas que han reaccionado (con NO, H₂S...) con una molécula conteniendo biotina, y después separar dichas proteínas del resto con un segundo compuesto.

Este tipo de técnicas han sido perfeccionadas a lo largo de la última década. El principal inconveniente que se ha encontrado es la falta de moléculas que tengan una alta especificidad y alta sensibilidad para unirse a las cisteínas afectadas pero no a las demás. Esto ha dado lugar a estudios en los que se

sobreestima la cantidad de tioles reactivos en una muestra (Zhang *et al.* 2014).

Una técnica recientemente descrita y que evita estos errores es el llamado “*tag-switch assay*” (Figura 9). En ella, se utiliza un primer agente que bloquea tanto las cisteínas nativas como los persulfuros formados por la exposición a H_2S . Después, se introduce una segunda molécula, consistente en un agente nucleófilo con mayor afinidad por los persulfuros y un agente revelador, que sustituirá a la molécula bloqueante solo en los persulfuros (Zhang *et al.* 2014). Uno de los métodos más comunes para separar las proteínas de interés es introducir biotina en la segunda molécula, de modo que a través de perlas de estreptavidina se pueden aislar posteriormente las proteínas (Park *et al.* 2015).

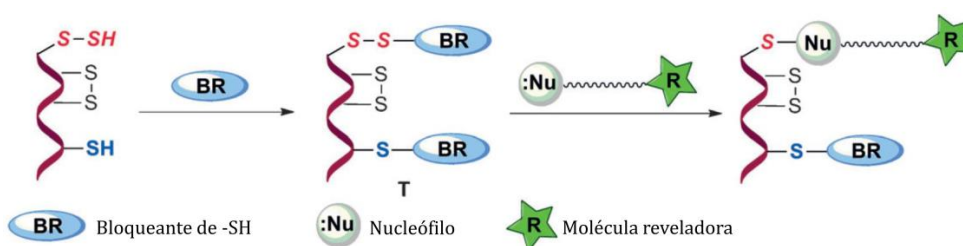


Figura 9. Técnica *tag-switch*. Inicialmente una molécula (BR) va a bloquear todos los grupos tiol. A continuación, otro reactivo (:Nu), conjugado con una molécula reveladora (R), reaccionará únicamente con los grupos persulfuro. Modificado de Zhang *et al.* 2014.

Para detectar la concentración de H_2S en un medio se pueden utilizar técnicas de cromatografía de gases, fluorimetría o electrodos, que alcanzan hasta concentraciones nanomolares, pero requieren de instrumental muy laborioso.

El método colorimétrico se ha utilizado muy frecuentemente, pero el más popular, basado en el uso de azul de metileno, ha sido puesto en duda en

cuanto a su sensibilidad y especificidad (Hughes *et al.* 2009; Paul & Snyder 2012a). Recientemente, se ha publicado otro método basado en la unión de H₂S a la molécula 4-cloro-7-nitrobenzofurazano (ClNO₂BF), dando un intenso color morado específico de fácil detección (Montoya *et al.* 2013).

2.3. El H₂S en la microbiología. Vías de producción

Al contrario que en las células eucariotas, la producción de ácido sulfhídrico por diferentes bacterias se conoce desde hace más de un siglo. Históricamente se consideraba un simple producto de desecho del metabolismo bacteriano y su único interés científico ha sido durante mucho tiempo su utilidad como método de diferenciación entre bacterias. Así, a principios del siglo XX, Orłowski, Burnet, Weissenbach, Jordan y Victorson, entre otros, utilizaron la producción de H₂S para diferenciar entre agentes patógenos (Clarke 1953), mientras que Tanner caracterizó la producción de H₂S a partir de diferentes fuentes (Tanner 1917).

A finales del siglo XX ya se sabía que algunas especies utilizaban diversos productos azufrados en su respiración, liberando H₂S al final de la cadena.

En la última década los conocimientos sobre NO y H₂S han cambiado profundamente en bacterias al demostrarse que protegen del estrés oxidativo provocado por diversos antibióticos, contribuyendo así a la resistencia a antimicrobianos de diferentes especies y a su supervivencia dentro de los macrófagos (Gusarov *et al.* 2009; Shatalin *et al.* 2011). Sin embargo, al menos en el caso del H₂S, también es posible que la acción no se deba al compuesto en sí, sino a que su síntesis conlleva la reducción de los niveles intracelulares de cisteína libre, la cual fomenta la reacción de Fenton (Luhachack & Nudler 2014; Álvarez, Neumann, *et al.* 2015; Frávega *et al.* 2016).

Debido a la gran cantidad de compuestos en los que el azufre está presente y la variedad de estados químicos en los que se puede encontrar, a lo largo del siglo XX ha habido resultados muy controvertidos sobre las vías metabólicas utilizadas por las bacterias, cuya discrepancia se vio sustentada por la disparidad en las técnicas diagnósticas empleadas. En esta tesis vamos a resumir únicamente aquellas vías bien descritas y que resultan de interés para nosotros.

2.3.1. Reducción disimilatoria y asimilatoria del sulfato

La reducción *disimilatoria* (o *desasimilatoria*) es aquella en la que el sulfato (el estado más oxidado del azufre) se utiliza como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia, con el objetivo de producir energía. El producto final, el H_2S , es excretado al medio, donde puede ser oxidado de nuevo. Este tipo de metabolismo está restringido a las bacterias denominadas “reductoras de sulfato/sulfuro” (SRB), uno de los grupos de seres vivos más primitivos sobre la Tierra, que contribuye activamente al mantenimiento del ciclo del azufre y cuyos miembros son en su mayoría anaerobios estrictos. Se encuentran ampliamente distribuidos por el planeta, en medios acuáticos y terrestres con abundante materia orgánica que alcanzan una situación de anoxia debido a procesos de descomposición microbiana. Algunos de ellos también forma parte de la microbiota de muchos seres vivos. Con excepción del género *Archaeoglobus*, todos los Procariotas reductores de sulfato son *Bacteria*, siendo algunos de los géneros más característicos *Desulfovibrio* o *Desulfobacter*. Las bacterias reductoras de sulfuro, como el género *Desulfuromonas* o *Campylobacter*, se encuentran en el medio ambiente asociadas muchas veces a las anteriores o a bacterias que oxidan el H_2S a S_0 (como las bacterias verdes del azufre o *Chlorobia*), formando así un pequeño ciclo anóxico del azufre (Stanier *et al.* 2005; Madigan & Martinko 2006).

La reducción *asimilatoria*, en cambio, es aquella en la que el sulfato se reduce a H₂S para incorporarse este posteriormente en compuestos orgánicos, tales como los aminoácidos cisteína y metionina. Esta reacción es llevada a cabo por multitud de seres vivos.

En el caso de *Salmonella Typhimurium*, una especie cuya producción de H₂S ha sido estudiada por varios autores y que va a ser utilizada como modelo a lo largo de esta tesis, las enzimas codificadas por los genes *cysJ*, *cysI* y *cysH* se encargan de la reducción de los compuestos azufrados a H₂S, mientras que las codificadas por *cysE*, *cysK* y *cysM* incorporan el mismo para producir cisteína (Figura 11). Además, parece existir un regulador global, *cysB*, con función tanto positiva como negativa (Barrett & Clark 1987; Price-carter *et al.* 2001). Estas enzimas son de gran importancia para regular los niveles intracelulares de cisteína, dado que esta contribuye al estrés oxidativo al fomentar la reacción de Fenton (Frávega *et al.* 2016; Álvarez, Neumann, *et al.* 2015).

2.3.2. Reducción del tetrionato y el tiosulfato

Por otro lado, dentro de las Enterobacterias y al igual que las reductoras de sulfato, la mayoría de las especies de *Proteus*, *Edwardsiella* y *Salmonella* (y algunos *Citrobacter*) son capaces de reducir tetrionato y tiosulfato, siendo en estos casos en los que la producción de H₂S se utiliza con fines taxonómicos (Barrett & Clark 1987).

Inicialmente, la tetrionato reductasa cataliza la reducción de tetrionato a tiosulfato (Figura 11). Esta enzima está codificada en *S. Typhimurium* por el operón *ttr*, presente en la isla de patogenicidad SPI-2 (Fàbrega & Vila 2013) y requiere de molibdeno en su estructura para ser activa (Hinojosa-Leon *et*

al. 1986). Parece ser que el tetrionato serviría como aceptor de electrones en la fosforilación oxidativa de estas bacterias. De hecho, es raro encontrar bacterias que reducen el tiosulfato si previamente no son capaces de obtener este a partir de la reducción de tetrionato, pues parece carecer de valor para las bacterias (Barrett & Clark 1987).

La producción de H₂S a partir de tiosulfato tiene lugar en *Salmonella* Typhimurium a través de su tiosulfato reductasa, que, al igual que otras reductasas, es también una molibdoproteína oxidoreductasa anclada a la membrana (Heinzinger *et al.* 1995). Está codificada por el operón *phs* (*production of hydrogen sulfide*), el cual está formado principalmente por tres genes: *phsA*, *phsB*, *phsC* (Figura 11). El primero codifica para la subunidad catalítica. *phsB* codifica la subunidad utilizada para la transferencia de electrones, poseyendo cuatro grupos Fe-S. El papel de *phsC*, aparte de anclar las otras dos subunidades a la membrana, no está del todo claro, aunque parece similar a las subunidades hidrofóbicas de otras reductasas y podría codificar para un citocromo asociado a la reducción de tiosulfato (Stoffels *et al.* 2012).

El sulfito producido por la tiosulfato reductasa puede ser aún más reducido por la sulfito reductasa disimilatoria anaeróbica, codificada por *asr* (Huang & Barrett 1990; Price-carter *et al.* 2001) y solo presente en *Salmonella* y *Edwardsiella* dentro de las Enterobacterias.

El conjunto de enzimas codificadas por *ttr*, *phs* y *asr* está presente en *Salmonella* Typhimurium, pero no en *E. coli*, por ejemplo, aunque estudios previos parecen indicar que ancestros comunes poseían dichos genes y

después se han perdido en diferentes especies (Price-carter *et al.* 2001). La ventaja que supone para *Salmonella* la posesión de estos genes es que el tetrionato favorece el crecimiento de *Salmonella* en determinadas condiciones, como es en anaerobiosis en presencia de etanolamina o propanodiol y utilizando B12; en estas condiciones el tetrionato actuaría como aceptor de electrones (Price-carter *et al.* 2001). Esta afirmación explicaría por qué la producción de H₂S es mayor en anaerobiosis que en aerobiosis (Bang *et al.* 2000). Además, está descrita la abundancia de tiosulfato en el aparato digestivo, como veremos más adelante.

2.3.3. Producción de H₂S en Procariotas por los genes ortólogos a Eucariotas

Por otro lado, Shatalin y colaboradores describieron que un gran número de bacterias también poseen en sus genomas los genes productores de H₂S ortólogos a los presentes en células eucariotas. Estos son *ssea* (vía 3MST) y *cbs/cse* (Shatalin *et al.* 2011). CBS/CSE utiliza tanto cisteína como homocisteína para producir H₂S. *Salmonella*, al igual que otras Enterobacterias, cuenta con la vía *sseA*, que utiliza la cisteína como sustrato inicial, la cual es convertida a 3-mercaptopiruvato (3-MP) por la enzima cisteína-aminotransferasa (CAT). Posteriormente, el 3-MP es metabolizado por la enzima 3-mercaptopiruvato transferasa a piruvato y H₂S (Figura 10).

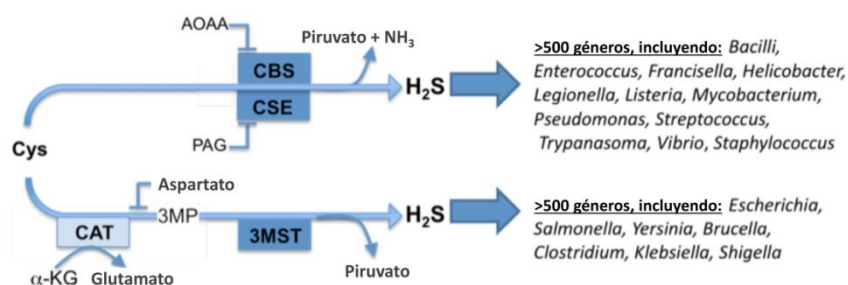


Figura 10. Producción de H₂S a partir de cisteína. Modificado de Shatalin *et al.* 2011.

2.3.4. Técnicas de detección de la producción de H₂S en microbiología

Las técnicas de detección se basan generalmente en la adición de diferentes metales en el medio, como puede ser plomo, hierro, bismuto, níquel, cobalto o manganeso, en forma de acetatos, carbonatos, citratos o cloruros (ZoBell & Feltham 1934; Clarke 1953). Estos metales reaccionan con el H₂S produciendo un pigmento o un precipitado de diferentes colores, generalmente negruzcos. Sin embargo, estos metales también resultan en muchas ocasiones tóxicos para las propias bacterias, disminuyendo tanto su nivel de crecimiento como el tamaño de las propias bacterias, como demostraron ZoBell y Feltham. Estos autores observaron que el ratio entre la concentración de plomo necesaria para detectar la producción de H₂S y aquella que resultaba tóxica para la bacteria era de solo 1:2. En cambio, para las sales de hierro ese ratio es de 1:40, pudiendo utilizarse por ello con mayor seguridad este elemento para detectar la producción de H₂S en el medio (ZoBell & Feltham 1934).

Para evitar la interferencia de los metales en la fisiología bacteriana, ya Sasaki (1912) y Tanner (1917), entre otros, utilizaron tiras de papel impregnadas con una sal de los metales, las cuales se colocan por encima del medio de cultivo. Entre estas tiras, las recomendadas en estudios comparativos y utilizadas con mayor frecuencia son las de acetato de plomo (ZoBell & Feltham 1934). Según varios autores, estas tiras de PbAc₂ pueden detectar hasta 1 partícula de H₂S en 7 millones de partículas de aire, siendo su especificidad y sensibilidad mayor que las técnicas de detección dentro del medio (Clarke 1953). Además, presentan la ventaja de ser semicuantitativas, al poder compararse la diferencia de producción, en el

tiempo y entre cepas, con mayor facilidad que los métodos de detección en medio sólido.

En cualquier caso, Clarke ya concluyó en sus estudios que cualquier resultado sobre la producción o no de H₂S por un organismo debería incluir los detalles de los métodos utilizados para su detección.

A la hora de catalogar una especie como positiva o negativa en cuanto a la producción de H₂S, es importante señalar la interferencia entre ambas vías y sustratos (a partir de tetrionato/tiosulfato o a partir de cisteína). De hecho, un error común antiguamente era considerar que si el tiosulfato no era específicamente añadido al medio de crecimiento, este no estaba disponible para la bacteria, pero el tiosulfato se puede generar durante la digestión proteica.

2.4. Relación entre H₂S, microbiota y hospedador

Con todo lo expuesto anteriormente, es evidente que el ácido sulfhídrico juega un papel muy importante tanto en Procariotas como en organismos superiores. Además, se ha comprobado que, no solo las bacterias tienen un impacto sobre la fisiología del H₂S de un hospedador, sino que este también afecta de forma recíproca sobre las bacterias.

Respecto a la influencia de un hospedador sobre su microbiota, en el campo del H₂S, hoy en día se sabe que las células epiteliales del aparato digestivo oxidan el H₂S, producido a su vez por bacterias reductoras de sulfato, a tiosulfato para evitar los efectos derivados de su toxicidad (Winter *et al.* 2010). Este tiosulfato puede, en presencia de especies reactivas de oxígeno, ser oxidado a tetrionato, el cual es utilizado por *S. Typhimurium* como aceptor de electrones mientras lo reduce de

nuevo a tiosulfato (Figura 11). Esto le proporciona una ventaja importante en cuanto a competición por el nicho se refiere (Bäumler & Sperandio 2016).

En el otro sentido, se ha comprobado que ratones libres de microbiota presentan niveles menores de H_2S (tanto libre como sulfano) en diferentes localizaciones orgánicas. Los niveles también eran menores a nivel del colon y ciego en estos ratones, al igual que sus reservas de sulfuro-sulfano en algunos tejidos (Shen *et al.* 2013). Esto significa que la microbiota intestinal no solo contribuye en gran medida a mantener los niveles de H_2S en el tracto digestivo, sino que es capaz de inducir la liberación de H_2S en otras partes del cuerpo.

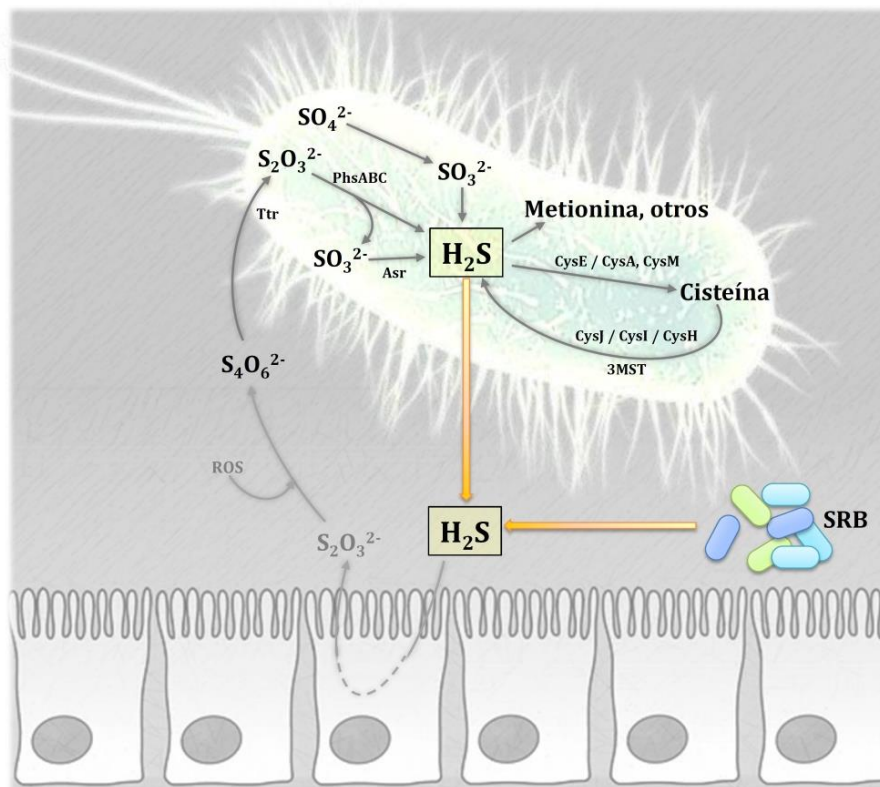


Figura 11. Ciclo del metabolismo del H_2S en el aparato digestivo. SRB: Bacterias Reductoras de Sulfato. ROS: Reactive Oxygen Species.

Dado que existen artículos que defienden tanto un efecto beneficioso del H_2S (referencia) como perjudicial (Attene-Ramos 2006) para diferentes enfermedades,

al igual que se ha demostrado la relación de la microbiota con diferentes patologías no relacionadas con el aparato digestivo (Stefka *et al.* 2014; Toh & Allen-Vercoe 2015; Hoisington *et al.* 2015), es fundamental continuar con la disección de la relación microbiota-H₂S-hospedador. Quizás el H₂S producido por Enterobacterias contribuye a su habilidad para colonizar tejidos en otras regiones del cuerpo. De hecho, se ha comprobado que sulfuros volátiles contribuyen a la patogenicidad de algunas bacterias orales al aumentar la permeabilidad de la mucosa (Basic *et al.* 2017). No solo eso, sino que hoy en día se sabe que algunas bacterias, como los enterococos, son capaces de inhibir la producción de H₂S por otras bacterias (Liu *et al.* 2011), sin que se sepa cómo ni con qué objetivo.

2.5. Relación del H₂S con la resistencia a antibióticos

Shatalin y colaboradores establecieron en el año 2011 que el H₂S promueve la resistencia a antibióticos de forma generalizada en diferentes especies. De acuerdo a artículos anteriores (Kohanski *et al.* 2007; Dwyer *et al.* 2010), la causa final del efecto bactericida de los antibióticos es un aumento de las especies reactivas de oxígeno.

Shatalin y colaboradores utilizaron la cepa tipo de *Escherichia coli* MG1655, que cuenta con el gen *sseA* para producir H₂S (la vía MST ortóloga a la de Eucariotas y ya mencionada anteriormente). Construyeron un mutante con el gen *sseA* deletado ($\Delta sseA$ o ΔMST) y un mutante con dicho gen sobreexpresado (*pMST*). Con estas cepas, observaron que el H₂S (y el NO) ejercían un papel protector frente a los antibióticos porque potencian los mecanismos antioxidantes de las bacterias, estimulando la acción de sus enzimas e impidiendo el desarrollo de la reacción de Fenton y el posterior daño en el ADN generado por ROS (Shatalin *et al.* 2011).

A día de hoy este es el único artículo fehaciente en este campo. Autores anteriores caracterizaron conjuntamente la resistencia a antibióticos y la presencia o ausencia de producción de H₂S en determinadas cepas (Lund *et al.* 1974; Jones *et al.* 1978). Sin embargo, estos artículos no relacionan en ningún momento ambas características entre sí.

De igual manera, posteriormente otros autores han afirmado que el H₂S protege de la acción de las fluoroquinolonas en *Salmonella* Typhimurium (Álvarez, Frávega, *et al.* 2015; Frávega *et al.* 2016). Sin embargo, los experimentos desarrollados se basan en alterar las vías de producción de H₂S a partir de cisteína o viceversa, produciendo en ambos casos una alteración de los niveles de cisteína, que, como ya se ha dicho, es un desencadenante de la reacción de Fenton y del estrés oxidativo. En la discusión comentaremos estos artículos más a fondo.

Por último, los propios artículos que afirmaban el efecto prooxidante de los antibióticos han sido rebatidos posteriormente (Keren *et al.* 2013; Liu & Imlay 2013), por lo que el tema en su conjunto requiere de estudios adicionales para comprenderlo en su totalidad.

OBJETIVOS

What is the most resilient parasite?

Bacteria?

A virus?

An intestinal worm?

An idea

From **Inception**

El ácido sulfhídrico es un gasotransmisor recientemente descrito pero cuyas implicaciones en multitud de procesos fisiológicos y patológicos están ya ampliamente reconocidos.

En microbiología, sin embargo, las referencias históricas son escasas, centrándose principalmente en su utilidad taxonómica o en su contribución al metabolismo del azufre por diversas especies.

En cambio, en el año 2011 se publicaron dos artículos que han sido decisivos para la realización de esta Tesis Doctoral. En primer lugar, se afirmó que el H₂S favorece la resistencia a antibióticos por conferir una protección generalizada frente al estrés oxidativo impuesto por estos. Por otro lado, se demostró que los enterococos son capaces de inhibir la producción de H₂S por otras bacterias.

Considerando estos conocimientos, nos interesamos en estudiar la fisiología del H₂S sobre diferentes especies bacterianas, tanto a nivel de su producción como de las funciones desempeñadas por el gasotransmisor dentro de las bacterias, con especial énfasis en el campo de la resistencia a antibióticos. Hoy en día, la resistencia de las bacterias a los antibióticos supone una de las principales amenazas mundiales para la salud y, lo que resulta más grave todavía, el descubrimiento de nuevos fármacos se encuentra prácticamente estancado desde hace décadas. Por ello, hacen falta abordajes innovadores que nos permitan enfocar la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos desde nuevas perspectivas y con diferentes estrategias.

Particularmente, nos interesamos en estudiar la interacción del H₂S con *Enterococcus*, una bacteria de enorme interés clínico por su resistencia a multitud de antibióticos. ¿Cuál es su objetivo al inhibir la producción de H₂S por otras bacterias?

Esta pregunta, a su vez, nos ha llevado a profundizar en un tema poco estudiado, el de la interacción entre bacterias a través del aire.

MATERIALES Y MÉTODOS

El modo de dar una vez en el clavo es dar cien veces en la herradura.

Miguel de Unamuno

1. Cepas y medios utilizados

Las cepas utilizadas para esta tesis pueden encontrarse en la Tabla 3. Los experimentos, salvo especificación contraria, se llevaron a cabo en medio sólido Triptona-Soja Agar (TSA) o medio líquido (TSB), obtenido de Oxoid (Oxoid Ltd., Reino Unido).

2. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos

2.1. Antibiogramas

Se realizaron siguiendo las recomendaciones oficiales (CLSI 2017; EUCAST 2017), en medio TSA mediante siembra con hisopo y partiendo de un inóculo de densidad 0,5 McFarland. Se incubaron a 37 °C entre 20 y 24 horas. Los antibióticos, el Na₂S y otros reactivos se obtuvieron de Sigma (Sigma-Aldrich Química SA, España). El hidrogenosulfuro de sodio (NaHS) se adquirió de Sigma y de Cayman (Cayman Chemical, EEUU). Cuando se realizaron los cultivos en anaerobiosis, se utilizó el sistema GENBag Anaerobiosis (bioMérieux, Francia).

Para incubar las muestras en presencia de H₂S, en un recipiente de cristal de 2 litros de capacidad, colocamos la base de una placa de Petri vacía, con 2 mililitros de agua en un lateral y nuestra cantidad deseada del donador de H₂S (NaHS) en el otro. Después, situamos dentro del recipiente nuestro experimento en cuestión (antibiogramas, inóculos líquidos) y cerramos herméticamente el recipiente. Finalmente, agitamos el recipiente ligeramente para que el agua y el NaHS sólido entren en contacto.

Tabla 3. Lista de cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Nombre abreviado	Descripción	Referencia o Nº de acceso GenBank
Enterococcus			
<i>E. faecalis</i> VE14089	V583 WT	Cepa V583 curada de sus plásmidos	Rigottier-Gois <i>et al.</i> 2011
<i>E. faecalis</i> JH2-2	JH2-2 WT	Cepa de laboratorio	Jacob & Hobbs 1974
<i>E. faecium</i> ATCC19434	<i>E. faecium</i>	Cepa tipo	ATCC
Salmonella Typhimurium			
<i>S. enterica enterica</i> serovar Typhimurium ATCC14028	<i>S. Typhimurium</i>	Cepa tipo	ATCC
<i>S. Typhimurium</i> Δ <i>phsABC</i>	<i>Δphs</i>	Mutante sin operón <i>phsABC</i>	Este trabajo
<i>S. Typhimurium</i> Δ <i>phsABC</i> + pTrc99a	<i>ΔphsABC</i> + pTrc99a	Mutante <i>Δphs</i> transformado con pTrc99a	Este trabajo
<i>S. Typhimurium</i> Δ <i>phsABC</i> + pSB74	<i>ΔphsABC</i> + pSB74	Mutante <i>Δphs</i> transformado con pSB74	Este trabajo
Escherichia coli			
<i>E. coli</i> DH5 α	DH5 α	Cepa de laboratorio	FOCUS (1986) 8:2,9
<i>E. coli</i> MG1655	MG1655 WT	Cepa de laboratorio	Shatalin <i>et al.</i> 2011
<i>E. coli</i> MG1655 + pSB74	MG1655 + pSB74	Cepa MG1655 transformada con pSB74	Este trabajo
<i>E. coli</i> MG1655 <i>MST</i> ⁻	<i>E. coli</i> <i>MST</i> ⁻	Cepa MG1655 con el gen de producción de H ₂ S interrumpido	Shatalin <i>et al.</i> 2011
<i>E. coli</i> MG1655 <i>MST</i> ⁻ + pSB74	<i>MST</i> ⁻ + pSB74	<i>MST</i> ⁻ productor de H ₂ S por el operón <i>phsABC</i> de <i>Salmonella</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> MG1655 p <i>MST</i>	p <i>MST</i>	Cepa MG1655 con el gen de producción de H ₂ S sobreexpresado	Shatalin <i>et al.</i> 2011
Otras cepas			
<i>Bacillus cereus</i> CECT193	<i>B. cereus</i>	Cepa tipo	CECT
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>C. freundii</i>	Cepa 19	Nuestro laboratorio
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	Cepa RyC: L15	Nuestro laboratorio
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC10031	<i>K. pneumoniae</i>	Cepa tipo	ATCC
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC19119	<i>L. ivanovii</i>	Cepa tipo	ATCC
<i>Proteus vulgaris</i> CEC174	<i>P. vulgaris</i>	Cepa tipo	CECT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Cepa A26	Nuestro laboratorio
<i>Staphylococcus aureus</i> COL	MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina	Archer <i>et al.</i> 1994

2.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La determinación de la CMI por E-test (bioMérieux, Francia) se realizó en medio TSA.

La determinación de la CMI por el método de microdilución en placa se realizó en medio TSB. Para determinar las CMI de *Enterococcus faecalis* en presencia de antibiótico y H₂S al mismo tiempo, el inóculo bacteriano para las CMIs se dividió en cuatro. Se preparó en el momento una solución de NaSH 10 mM e inmediatamente se añadió a tres de los cuatro inóculos bacterianos para que la concentración final de H₂S fuera 100, 200 o 400 μ M; el cuarto inóculo se utilizó como control.

Las CMI de *Salmonella* Typhimurium se determinaron por el método de microdilución en placa, en ausencia y presencia de tiosulfato sódico (T-S), preparado en agua en los últimos 7 días, a una concentración final de 20 mM.

2.3. Curvas de crecimiento y de supervivencia

Las curvas de crecimiento de *E. faecalis* se realizaron en medio TSB. Se inoculó una dilución 1:1000 de un preinóculo O/N crecido a 37 °C. En los experimentos incubados en presencia de H₂S, las muestras se introdujeron en una cámara al igual que para los antibiogramas. A las 12 y 24 horas se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonia en cada muestra.

Las curvas de crecimiento y de supervivencia de *S. Typhimurium* se realizaron en medio LB, siguiendo el protocolo previamente publicado (Shatalin *et al.* 2011). Brevemente, de un preinóculo crecido *overnight* (O/N) a 30 °C, se realizó una dilución 1:100 y los inóculos se incubaron a 37 °C hasta una densidad óptica (D.O.) de 0,7-0,8 aproximadamente. Después, se realizó una dilución 1:100 en 10 mL y las muestras se incubaron a 37 °C y 150 rpm, midiéndose la D.O. cada hora. Las muestras indicadas se suplementaron con T-S 20 mM y/o diferentes antibióticos.

3. Enfrentamientos

Para poder testar el efecto del H₂S desprendido por *Salmonella* sobre otras especies, se diseñó un sistema en el que ambas bacterias se encontraran separadas físicamente pero enfrentadas entre sí (Figura 12).

Para ello, se preparó en TSA un antibiograma de la cepa a testar. Con la cepa de *Salmonella* Typhimurium se procedió de la misma manera en placas de TSA con tiosulfato 20 mM, pero sin colocar ningún disco de antibiótico.

Después, se retiraron las tapas y se enfrentaron ambas placas, utilizando dos tiras de cinta adhesiva en extremos opuestos para inmovilizar el sistema. Se colocó una tira de *parafilm* (permeable al paso de aire) para “sellar” el sistema. Finalmente, las placas se incubaron por un máximo de 24 horas a 37 °C y se leyeron inmediatamente después.

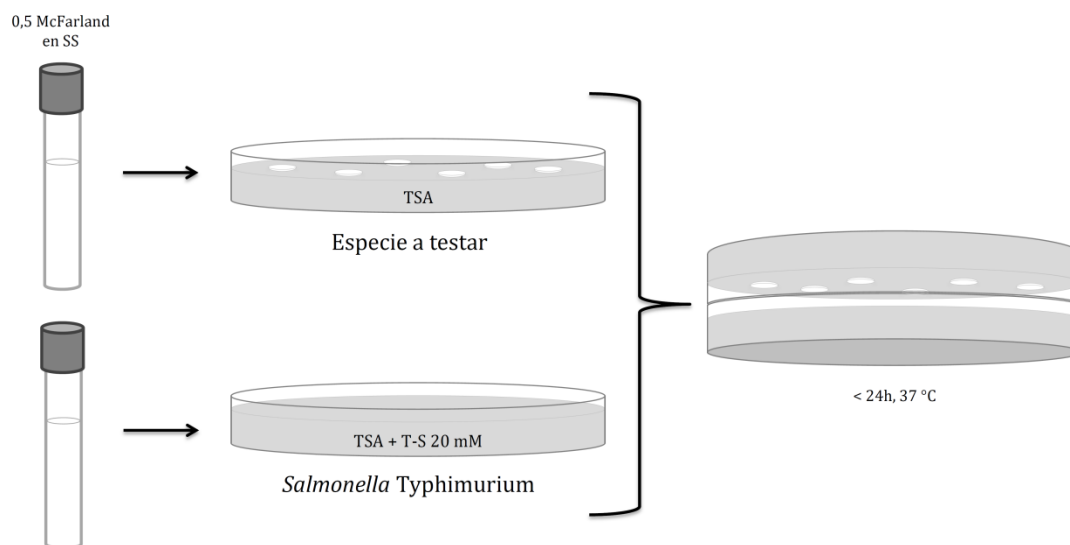


Figura 12. Enfrentamientos entre *Salmonella Typhimurium* y otras especies. SS: solución salina; TSA: Soja-Triptona Agar. T-S: tiosulfato sódico.

4. PCRs, manipulación de ADN y secuenciación

Los oligonucleótidos y plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 4 y Tabla 5), respectivamente. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se adquirieron de Sigma (Sigma-Aldrich Química SA, España). Para las PCRs se utilizaron reactivos de Biotools (Biotools, EEUU) y TAQ polimerasa (Biotools, EEUU) o polimerasa Phusion (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU).

La purificación de productos de PCR se llevó a cabo con el kit *PCR purification* o el kit *Gel extraction* (Qiagen, EEUU). La extracción de ADN genómico y plasmídico se realizó con los kits *QIAamp DNA mini*, *QIAprep Miniprep* y *Midiprep* (Qiagen, EEUU).

Tabla 4. Lista de cebadores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Fuente o referencia
Delección de genes <i>in-frame</i>		
H1_phsABC_P1	TACAAATTAATATAATCTTCAGCTATATCTAATAACA GGAGGTTATATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	Este trabajo
H2_phsABC_P2	TTCTTGCTGACATTATTTTATGGATACGCTCAGACCGC GGACTTATCCCCGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Este trabajo
pKD46_F	GCTAATCCCTAACTGCTGGC	Este trabajo
pKD46_R	CGTTCATGGCTGAACTCCTG	Este trabajo
phsABC_ext_F	GGTTTATCGTGTGACATGC	Este trabajo
phsABC_ext_R	GTCAGGATGGTCTCTATTTGC	Este trabajo
pCP20_F	GGTATGAGTCAGCAACACC	Este trabajo
pCP20_R	GCTCAATGTACCTATAACCAG	Este trabajo
M13/pUC Rev	AGCGGATAACAATTCACACAGG	Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU
pBAD Rev	GATTTAATCTGTATCAGG	Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU
Mutagénesis por transposición aleatoria		
Genta_probe_F	ACAGAGCCTTGGGAAGATGA	Zhang <i>et al.</i> 2012
Genta_probe_R	TGCCTTAACATTTGTGGCATT	Zhang <i>et al.</i> 2012
F Cloramph	TAGGCCTATCTGACAATTC	Este trabajo
R Cloramph	AATAGCGACGGAGAGTTAGG	Este trabajo
IPCR_HaeIII_F	AAACAGGAATTTATCGAAAATGGT	Zhang <i>et al.</i> 2012
IPCR_HaeIII_R	CCCCCTGAAATCCTTACAT	Zhang <i>et al.</i> 2012

Tabla 5. Lista de plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Descripción	Nº acceso GenBank	Fuente o referencia
Delección de genes <i>in-frame</i>			
pKD46	Plásmido <i>helper</i> termosensible, portador del sistema de recombinación Red del fago λ . Ara ^{Ind} , Amp ^R	AY048746	Datsenko & Wanner 2000
pKD13	Plásmido portador del gen de resistencia a kanamicina usado como secuencia patrón. Kan ^R	AY048744	Datsenko & Wanner 2000
pCP20	Plásmido <i>helper</i> termosensible, portador de la recombinasa FLP. Amp ^R	-	Cherepanov & Wackernagel 1995
Producción de H₂S			
pTrc99a	Vector vacío	U13872.1	Amann <i>et al.</i> 1988
pSB74	pTrc99a + Δ phsABC	-	Bang <i>et al.</i> 2000
Mutagénesis por transposición aleatoria			
pZXL5	Plásmido portador del transposón <i>mariner</i> (que incluye un gen de resistencia a kanamicina), una transposasa <i>mariner</i> . Genta ^R , Clor ^R	JQ088279	Zhang <i>et al.</i> 2012

La secuenciación de fragmentos de ADN de interés se realizó en Secugen (Secugen SL, Madrid, España) a partir de productos purificados de las correspondientes PCRs. Para aquellas cepas que se requería su secuenciación completa, se llevó a cabo en MicrobesNG (Birmingham, Reino Unido) utilizando la tecnología Illumina (MiSeq, Illumina, EEUU). Los contigs fueron alineados mediante el software Mauve 2.4.0 (Darling *et al.* 2010) y su posterior análisis se realizó con el software Geneious 8.1.9 (Kearse *et al.* 2012).

5. Preparación de células electrocompetentes

Las células electrocompetentes de *E. faecalis* y *E. coli* se prepararon inoculando un matraz de Erlenmeyer con medio BHI (bioMérieux, Francia) con una dilución 1:100 de un inóculo O/N de la cepa. Se incubó a 37 °C y 150 rpm hasta una densidad óptica (D.O.) de 0,6 aproximadamente, tras lo cual se dejó reposar el cultivo en hielo durante 20 minutos. A continuación se centrifugó 10 minutos a 5000 rpm y el pellet se resuspendió en 50 mL de agua destilada estéril a 4 °C. Se repitió el proceso de reposo-centrifugación, reduciendo el volumen en el siguiente ciclo a 25 mL de agua estéril fría y, en los posteriores, a 2 mL y a 500 µL de agua con glicerol al 10%, respectivamente.

Las células electrocompetentes de *Salmonella* Typhimurium se prepararon de manera similar, pero incluyendo algunas variaciones establecidas en protocolos ya publicados (Gerlach *et al.* 2009). Principalmente, se utilizó LB (Conda Laboratorios, España) en lugar de BHI, agua con glicerol al 10% en todos los pasos y el inóculo se dejó reposar 15 minutos en frío antes de cada centrifugación. Se utilizaron las células electrocompetentes de *S. Typhimurium* inmediatamente después de su preparación.

Para la transformación se utilizaron cubetas de electroporación de 2 mm de grosor y el sistema Gene Pulser (Bio-Rad, EEUU) con las siguientes condiciones: 1,7 kV, 25 μ F y 200 Ω .

6. Construcción de mutantes de delección de *S. Typhimurium*

Para la delección de *phsABC* conservando el marco de lectura (*in-frame*), se utilizó un método previamente descrito (Baba *et al.* 2006; Datsenko & Wanner 2000) y que aparece resumido en la Figura 13. Para ello, se utilizaron tres plásmidos (Tabla 5) y una serie de cebadores (Tabla 4).

6.1. Amplificación del operón *phsABC* a deleccionar

Para la delección del operón se diseñaron dos cebadores largos. El cebador H1P1 contiene, en el sentido 5'-3', 50 nucleótidos inmediatamente anteriores al gen de interés (siendo los tres últimos nucleótidos el codón de iniciación), seguidos de los 20 nucleótidos anteriores a la región FRT⁹ que precede al gen de resistencia a kanamicina del plásmido pKD13.

El cebador H2P2 contiene, en el sentido 5'-3', los 21 últimos nucleótidos del gen a deleccionar (acabando en el codón stop) más los 29 nucleótidos siguientes, seguidos de los 20 nucleótidos posteriores a la región FRT que sucede al gen de resistencia a kanamicina del plásmido pKD13.

Realizando una PCR del plásmido pKD13 con estos cebadores se obtuvo un fragmento (Figura 13) que contiene el cassette de resistencia a kanamicina introducido entre las secuencias anterior y posterior a la región a deleccionar en *S. Typhimurium*.

⁹ FRT: Sitio de reconocimiento de la recombinasa (*Flippase Recognition Target sites*).

6.2. Sustitución del operón *phsABC* por el cassette de resistencia a kanamicina

Este plásmido termosensible pKD46 contiene el sistema Red del fago λ , que facilita la recombinación homóloga al inducirse su expresión por arabinosa. Dicho plásmido fue transformado en *S. Typhimurium*. A continuación se electroporó el fragmento de PCR obtenido en el paso anterior y, al inducirse la recombinación, se generaron mutantes cuyo operón *phsABC* ha sido sustituido por el cassette de resistencia. Dicho cassette permite seleccionar únicamente los mutantes al sembrar en un medio con kanamicina. Posteriormente, al incubar a 43 °C se seleccionaron colonias que habían perdido pKD46.

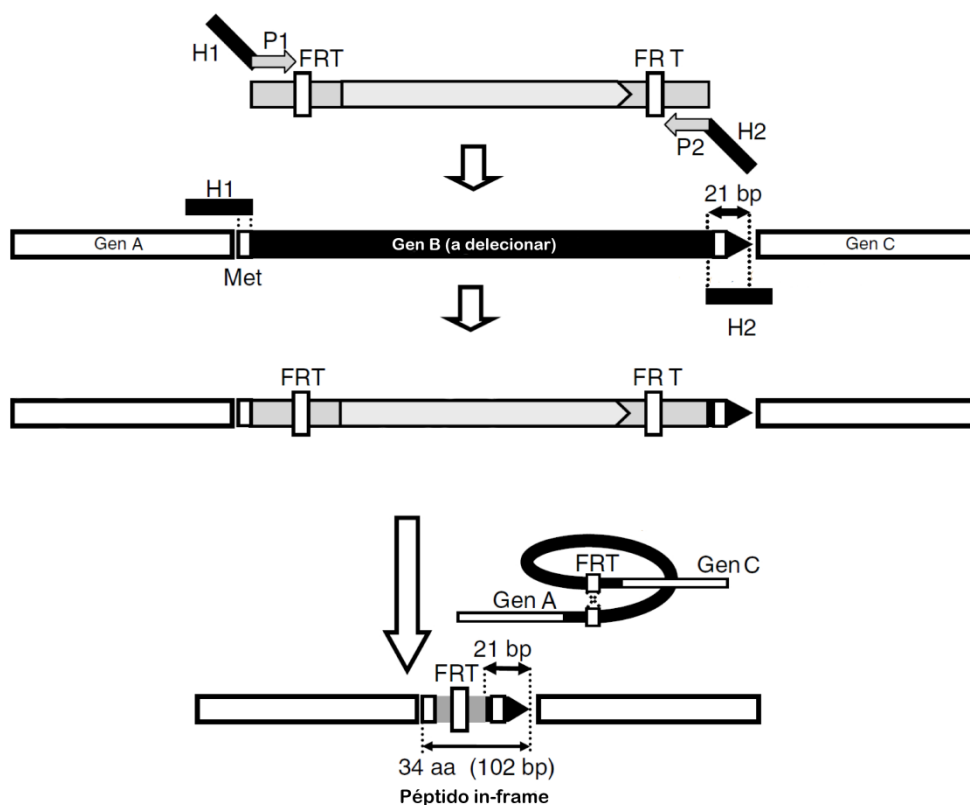


Figura 13. Protocolo para delección de genes manteniendo el marco de lectura. FRT: Secuencias diana de la recombinasa. Modificado de Baba *et al.* 2006.

6.3. Excisión del cassette de resistencia a kanamicina

Finalmente, transformamos en nuestro mutante el plásmido termosensible pCP20 (Cherepanov & Wackernagel 1995), el cual codifica para la recombinasa flipasa. Esta induce la excisión del gen de resistencia a kanamicina al reconocer las secuencias FRT que se encuentran inmediatamente antes y después del mismo, dejando una cicatriz de 102 pares de bases verificable por PCR y que, por tanto, mantiene el marco de lectura intacto.

Utilizando un par de cebadores (phsABC_ext_F y phsABC_ext_R) que hibridan en las inmediaciones del operón, se pudo confirmar la delección de *phsABC*.

El mutante de delección fue complementado transformando el vector pTrc99a conteniendo el operón *phsABC* (dicho plásmido se llama pSB74). El vector vacío pTrc99a también fue transformado como control negativo.

7. Selección de mutantes resistentes a cefotaxima-H₂S

7.1. Mutagénesis por transposición aleatoria

En primer lugar se construyó una librería de mutantes por la técnica de transposición aleatoria diseñada por Zhang y colaboradores (Zhang *et al.* 2012). Para ello, se transformó el plásmido pZXL5 (Figura 14) en la cepa de interés, en nuestro caso *E. faecalis* JH2-2. Este plásmido, termosensible, contiene: el origen de replicación ColE (para gram negativos), el origen termosensible pWV01 (para gram positivos), un transposón *mariner* (con el gen *aac(6')-aph(2'')* de resistencia a gentamicina dentro del mismo), una transposasa *mariner* inducible por nisina (por el sistema *nisK-nisR*) y un cassette de resistencia a cloranfenicol (*cat*).

presumiblemente porque el transposón ha interrumpido una vía clave en la sensibilización de *Enterococcus* al efecto sinérgico de ambos compuestos.

Finalmente, el genoma de aquellas colonias de interés se extrajo y se digirió completamente utilizando la enzima HaeIII (Takara). Los fragmentos se religaron mediante la ligasa T4 (New England Biolabs, EEUU). Mediante una PCR con oligonucleótidos que hibridan dentro del transposón, se secuencia el entorno genético en el cual se ha insertado el mismo (Figura 15).

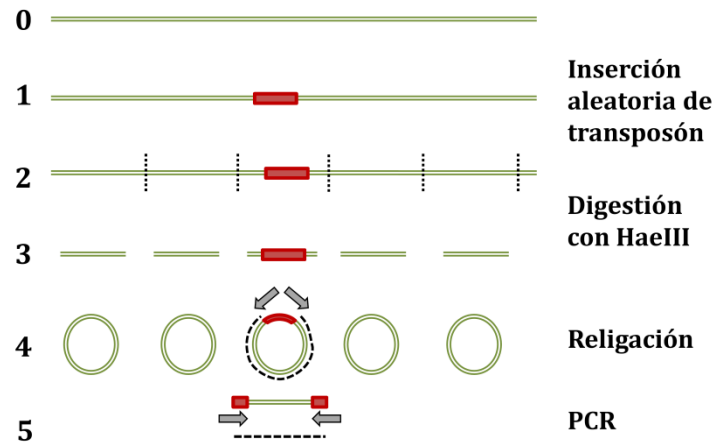


Figura 15. Técnica utilizada para identificar la región genómica en la que se inserta aleatoriamente el transposón.

7.2. Mutagénesis espontánea

Por un lado, se prepararon placas de medio TSA con concentraciones crecientes de cefotaxima, desde 0 hasta 256 mg/L. En cada placa se sembraron homogéneamente 100 μ L de un inóculo O/N de la cepa V583. Los experimentos se incubaron tanto en ausencia como en presencia de H_2S 0,1 gramos, hasta un máximo de 48 horas, contando el número de colonias cada 24 horas y verificando por antibiograma el fenotipo de las colonias obtenidas.

Por otro lado, se prepararon placas de TSA con gradiente del antibiótico cefotaxima desde 0 hasta 256 mg/L (Figura 16). Para crear dicho gradiente, se vierte la mitad del agar (libre de antibiótico) y se mantiene inclinada la placa de Petri hasta que el medio se solidifique completamente. A continuación, se añade la segunda parte del medio, conteniendo nuestra concentración máxima de cefotaxima, y se deja solidificar en posición horizontal, de forma que cubra la pendiente creada anteriormente (Szybalski & Bryson 1952).

Inmediatamente después de su solidificación, se realizó un antibiograma por inundación. Para ello, se preparó una suspensión 0,5 McFarland de nuestra cepa en solución salina y se preparó una dilución 1:10 de esta en solución salina. A continuación, se vertieron 2 mL en la placa de gradiente y se dejó reposar 15 minutos, agitando la placa ligeramente cada 2-3 minutos. Después, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la placa antes de la incubación. Las colonias obtenidas a mayor concentración de antibiótico fueron resembradas y testadas respecto a su resistencia a cefalosporinas. Las colonias que mantuvieron el fenotipo de interés fueron secuenciadas.

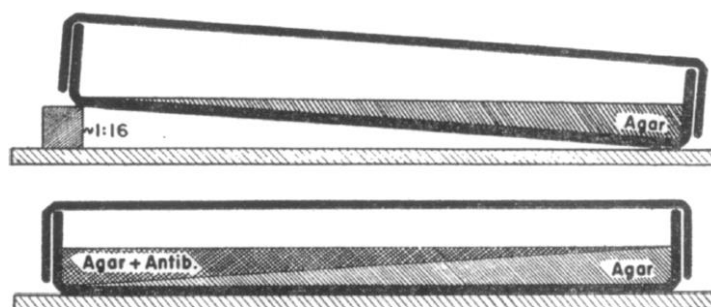


Figura 16. Protocolo de creación de una placa con gradiente de antibiótico. De Szybalski & Bryson 1952.

8. Medición de la producción bacteriana de H₂S

8.1. Detección en medio Kligler

Las cepas de interés se inocularon con asa de picadura en un tubo de medio Kligler (bioMérieux, Francia) y se incubaron O/N a 37 °C. En los casos indicados, el medio se suplementó con T-S 20 mM adicional.

8.2. Detección con tiras de acetato de plomo

Para la detección con tiras de acetato de plomo (PbAC₂) se siguieron las instrucciones de la casa comercial (Sigma-Aldrich Química SA, España). Brevemente, se inocularon tubos de agua peptonada (Oxoid Ltd., Reino Unido) con las cepas de interés. Después, se colocó internamente, junto a la boquilla del tubo, una tira y se enroscó ligeramente el tapón. El nivel de coloración de las tiras se interpretó siguiendo una escala de 6 posibles valores (Figura 17).

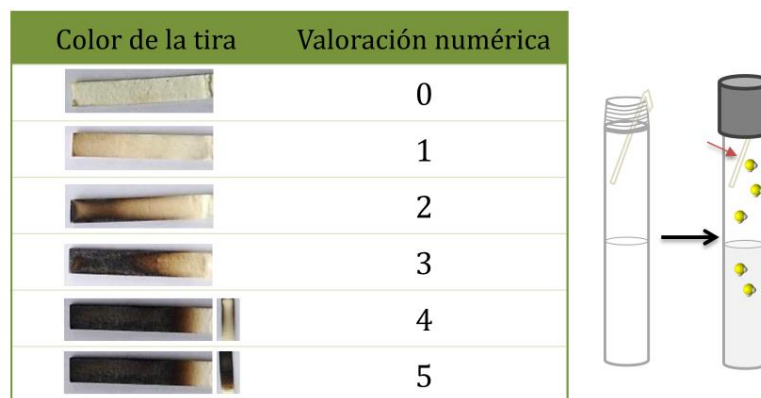


Figura 17. Escala de valores de producción de H₂S, según el nivel de oscurecimiento de la cara expuesta. Los niveles adicionales mostrados en 4 y 5 hacen referencia a la coloración de la cara no expuesta (indicada con una flecha roja).

Para determinar por tiras de PbAC₂ la producción de H₂S de las cepas de *E. coli* MG1655 WT, Δ MST y pMST, se siguió el protocolo utilizado por los autores (Shatalin *et al.* 2011), utilizando las tiras de Sigma (Sigma-Aldrich Química SA, España). Brevemente, se realizó una dilución 1:50 de

preinóculos O/N en medio LB y las muestras se incubaron en agitación a 37 °C durante 20 horas.

9. Determinación de la sulfhidrilación interna

Para determinar el nivel de sulfhidrilación interna de las diferentes bacterias utilizamos una técnica fluorimétrica actualmente en desarrollo por el equipo del Doctor Milos Filipovic, del *Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS-Université de Bordeaux* (Francia). El protocolo consta de las siguientes partes.

9.1. Extracción total de proteínas de *Enterococcus faecalis*

Se inocularon botellas de 10 mL de medio TSB con 10 µL de un preinóculo de JH2-2 incubado O/N. Se suplementaron las diferentes muestras con los compuestos apropiados según el caso: cefotaxima 8 mg/L, cefaclor 8 mg/L y/o H₂S 250 µM. Para estos experimentos, como fuente de H₂S se utilizó sulfuro de sodio (Na₂S). Antes de cada experimento, se preparó una solución de Na₂S 1000 mM en H₂O pretratada con resina Chelex (Bio-Rad, EEUU) y mantenida en una atmósfera inerte. Cada muestra se inoculó con H₂S 250 µM utilizando una jeringa Hamilton.

Tras un periodo de incubación de 6 horas a 37 °C y 100 rpm, las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 3 minutos y el pellet bacteriano se lavó con PBS. Tras volver a centrifugar se desechó el sobrenadante y se añadió a cada muestra 1 mL del tampón de lisis RIPA (a pH 7,41) conteniendo inhibidor de proteasa al 0,01% y ClNO₂BF a 25 mM (preparado en metanol), ambos obtenidos de Sigma (Sigma-Aldrich Química SA, España).

Para favorecer una lisis total, las muestras se homogeneizaron pipeteando varias veces con una jeringa y aguja de insulina y, posteriormente, se sometieron a 3 ciclos de sonicación de 1' (190 MHz) – 2' pausa.

9.2. Marcaje por fluorescencia de las muestras

El protocolo de marcaje de los residuos de cisteína que reaccionan con el H₂S puede encontrarse resumido en la

Figura 18. El tampón de lisis utilizado en el paso anterior ya contiene ClNO₂BF (4-Cloro-7-nitrobenzofurazan). Este compuesto se une a los residuos persulfuro (R-S-S) y, con menor afinidad, al ácido sulfénico (R-S-OH) y a las cisteínas nativas (R-SH). Por lo tanto, este compuesto se añade al mismo tiempo que se lisan las bacterias para asegurarse de que las proteínas no estén expuestas a posteriores modificaciones durante el proceso de lisado.

Tras la lisis, las muestras se incubaron a 37 °C durante 1 hora para que el ClNO₂BF presente en el *buffer* tuviera suficiente tiempo para reaccionar con todas las cisteínas. Después, las proteínas se precipitaron por el método de metanol-cloroformo. Tras lavar con metanol y secar completamente las muestras, se añadieron 2 µL del detergente sodio dodecil sulfato (SDS) al 20% directamente sobre cada pellet. Tras 15 minutos de incubación, se añadieron 100 µL de tampón HEPES 50 mM a 4 °C y se disolvió completamente el pellet, mediante agitación o incubación en un baño sonicador.

A continuación se añadió DAz-2 (4-(3-azidopropyl)ciclohexano-1,3-diona) a 100 µM. Este compuesto es capaz de sustituir al ClNO₂BF, pero solo cuando este se encuentra unido a un radical persulfuro. Las muestras se incubaron O/N a 4 °C. Posteriormente, se limpiaron utilizando columnas Bio-Spin (Bio-Rad, EEUU) y se determinó la concentración proteica de cada muestra con el

método DC Protein Assay (Bio-Rad, EEUU). Las muestras se ajustaron a la de menor concentración diluyendo en HEPES 50 mM.

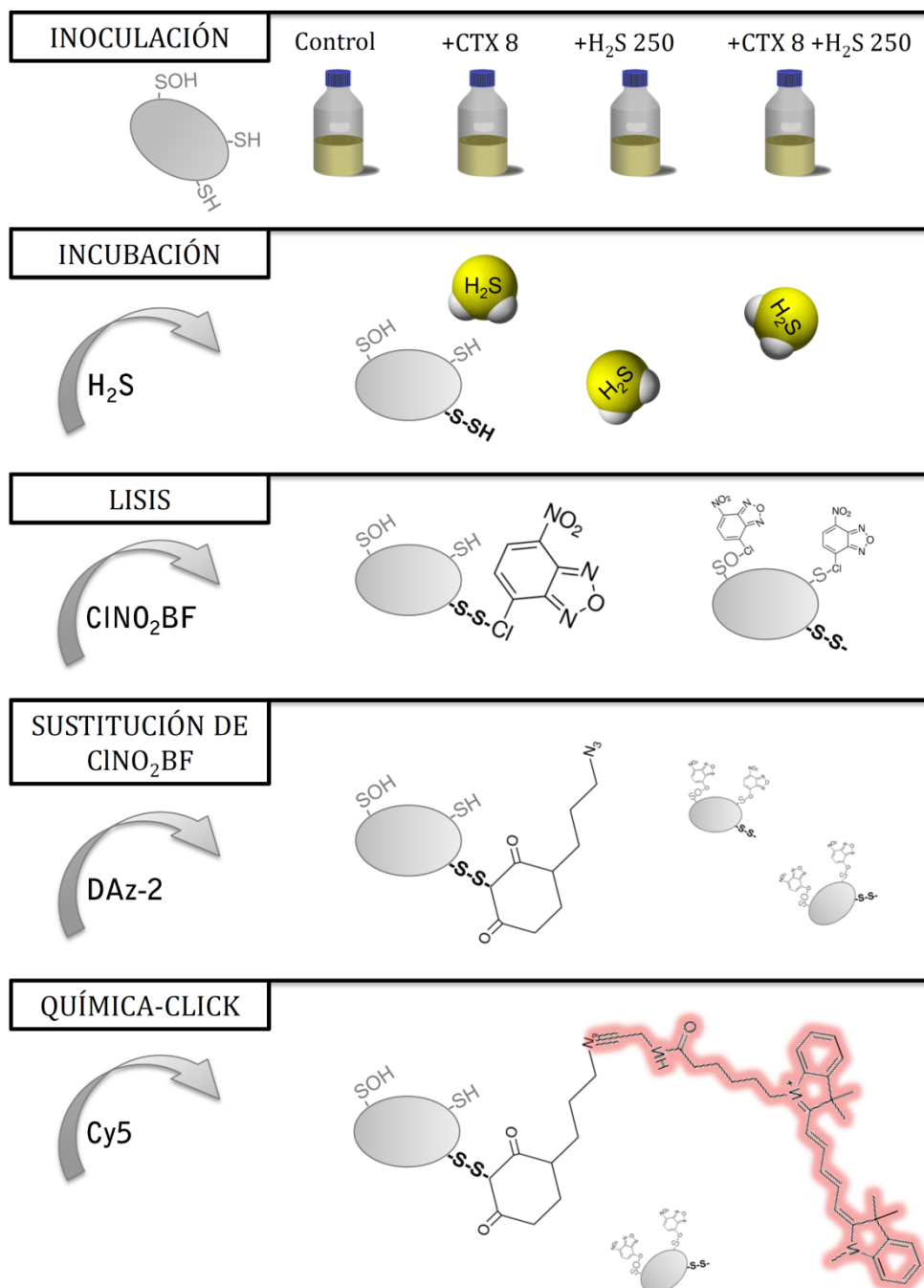


Figura 18. Marcaje de los residuos de cisteína que reaccionan con el H₂S. A la izquierda se indican las diferentes etapas del protocolo y el reactivo principal en dicho paso. El compuesto Cy5 emite luz roja.

Finalmente, para poder visualizar los residuos proteicos que habrían reaccionado con H₂S, formándose persulfuros, se utilizó una técnica de química-click (*click chemistry*). Se añadió a las muestras, de forma secuencial, el fluoróforo Cy5-alquino a 50 μM, el complejo de Cobre(II)-Tris(benzyltriazolylmethyl)amine [Cu(II)-TBTA] a 200 μM y ácido ascórbico a 400 μM. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 3 horas (aunque en casos de poca luminiscencia se incubaron O/N).

Cy5 es una cianina fluorescente cuyos niveles máximos de absorción y emisión ocurren a unas longitudes de onda de 646 y 662 nanómetros, respectivamente, por lo que emite luz roja. Al utilizarse en su formulación Cy5-alquino, se une al residuo -azida, presente en DAz-2. La reacción es catalizada por el complejo Cu(II)-TBTA, el cual necesita de la acción del ácido ascórbico para reducir el Cu(II) a Cu(I). Por tanto, solo se apreciará fluorescencia en aquellos residuos de cisteína que fueron modificados a persulfuros por la acción del H₂S.

9.3. Análisis de las muestras

Tras el paso de química-click, las muestras se mezclaron en una proporción 3:1 con tampón Laemmli conteniendo 10% de β-mercaptoetanol y se incubaron a 95 °C durante 5 minutos.

Después, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), utilizando geles al 10% y corriendo las muestras en oscuridad, inicialmente a 90 V durante 15 minutos y después a 130 V durante 80 minutos. Como marcador, se utilizó PageRuler Prestained Protein Ladder de 10 a 180 kDa (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU).

Posteriormente, los geles se fijaron durante 30 minutos en un tampón fijador-decolorador conteniendo 12,5% de metanol y 4% de ácido acético.

Finalmente, los geles se visualizaron utilizando el sistema G:BOX y el software Syngene.

Para comprobar la concentración total de proteínas presente en cada banda, los geles se tiñeron con Azul de Coomassie durante 15 minutos, se retiró el exceso de colorante mediante el tampón fijador-decolorador mencionado anteriormente y se visualizaron los geles mediante el software GeneSnap (Syngene, Reino Unido). La normalización y análisis de las imágenes se realizó utilizando el software ImageJ.

RESULTADOS

Ningún descubrimiento se haría ya si nos contentásemos con lo que sabemos.

Séneca

I. Efecto del H₂S sobre las bacterias y reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas en *E. faecalis*

Inicialmente, nos interesamos en estudiar la influencia del H₂S sobre una serie de bacterias de interés clínico. Utilizamos hidrógeno sulfuro de sodio (NaHS), un donador de H₂S disponible comercialmente en forma de escamas (Figura 19), las cuales se disuelven en agua liberando el gas.

Como primer paso, quisimos comprobar si la presencia de este donador en el medio podía afectar al crecimiento bacteriano. La adición de 0,1 gramos de NaHS en el centro de placas de BHI previamente sembradas con diferentes especies produjo un efecto similar en las Enterobacterias testadas (*Salmonella* Typhimurium, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* entre otras), resultando en un crecimiento típico con un halo de inhibición alrededor de la escama de NaSH. En esta zona asumimos que se alcanza una concentración de H₂S demasiado alta o que se produce una alteración agresiva del medio por parte de este.

Para otras especies el efecto fue muy diferente. *Listeria ivanovii* o *Staphylococcus aureus* fueron incapaces de crecer. *Enterococcus faecalis* presentó un crecimiento similar al control sin H₂S, creciendo la cepa V583 mejor que la cepa de laboratorio JH2-2. También observamos que el crecimiento era mejor en el medio TSA que en BHI, por lo que decidimos utilizar el primero para el resto de los experimentos, al ser además el medio utilizado por Liu en su trabajo (Liu *et al.* 2011).

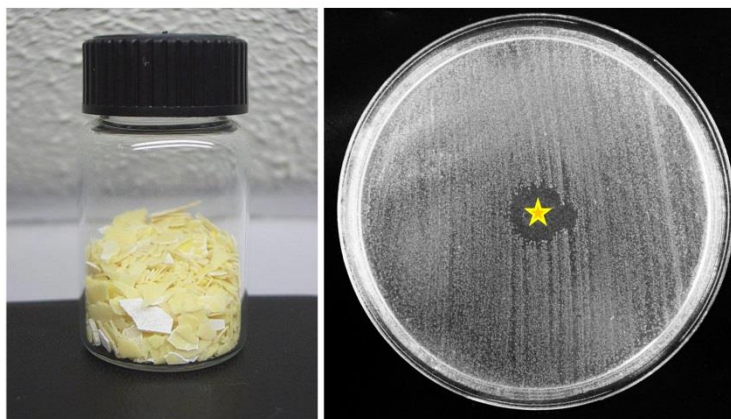


Figura 19. Izquierda: NaHS, imagen cortesía de woelen.homescience.net/science/. Derecha: halo de inhibición alrededor del punto en el que se colocaron 0,1 gramos de NaHS (representado por una estrella).

1.1. Efecto del H₂S sobre el perfil de antibiorresistencia

A continuación, quisimos realizar antibiogramas de diferentes especies en ausencia y presencia de H₂S. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el NaHS es un producto bastante impuro, como advierten la propia casa comercial (www.caymanchem.com/product/10012555) y algunos artículos (Wedmann *et al.* 2014). Por esta razón, decidimos exponer nuestras bacterias al H₂S liberado por NaHS sin poner este en contacto directo con las cepas. Para ello, diseñamos una técnica, descrita en Materiales y Métodos, en la cual colocamos el NaSH en otra placa con agua, y, a su vez, tanto esta como nuestras muestras se introducen en un recipiente cerrado herméticamente. Así, el H₂S, gracias a su volatilidad, debería actuar a distancia, disminuyendo la probabilidad de observar efectos debidos a otros compuestos secundarios.

Con estos experimentos, para las especies *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* y *Pseudomonas aeruginosa* no observamos ninguna diferencia significativa frente a los antibióticos testados, aunque hubo algún pequeño incremento o reducción en el tamaño de algunos halos (ver Tabla S1). De las especies *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium* hablaremos más adelante.

1.2. Reversión de la resistencia a cefalosporinas en *Enterococcus*

Al realizar antibiogramas de *E. faecalis* en presencia de H₂S, preliminarmente con una escama de NaSH en el centro de la placa, descubrimos que junto con el aminoglucósido estreptomycin se observaba un cierto efecto sinérgico, mientras que para la cefalosporina ceftriaxona se produjo un marcado halo de inhibición (Figura 20), lo cual llamó nuestra atención inmediatamente.

Al repetir el antibiograma colocando NaSH en otra placa, comprobamos que el perfil de resistencia era idéntico al obtenido anteriormente y que, para la cepa de *E. faecalis* V583, la CMI de cefotaxima (otra cefalosporina análoga a ceftriaxona) se reducía hasta casi 100 veces, de una resistencia inicial de más de 256 mg/L a 4 mg/L (Figura 20).

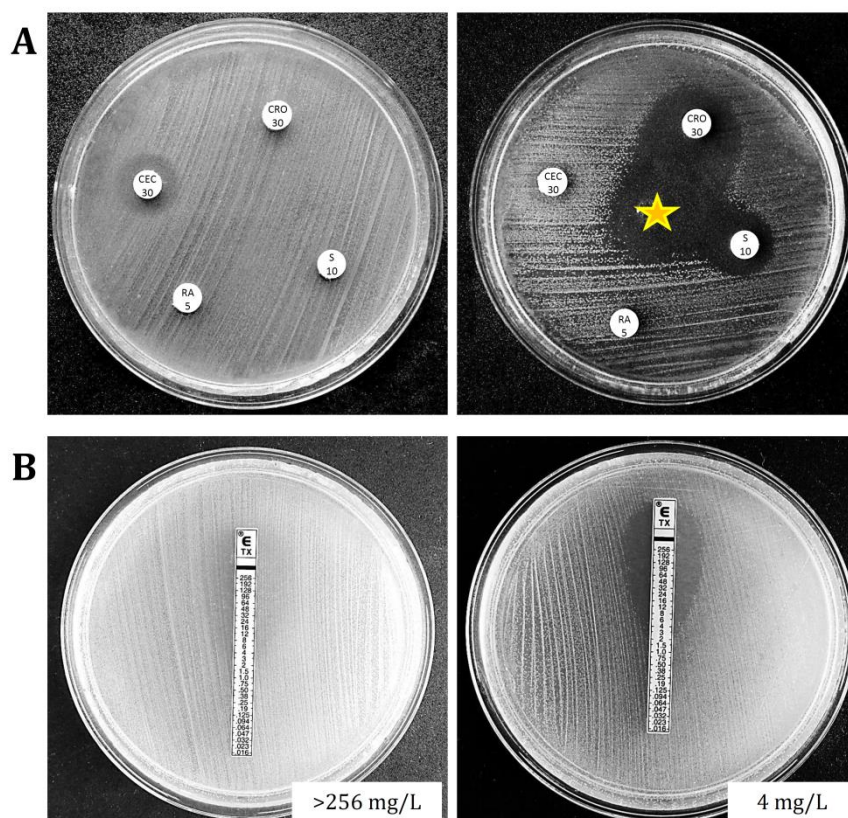


Figura 20. *E. faecalis* V583. A: Antibiograma de cefaclor (CEC), ceftriaxona (CRO), estreptomycin (S) y rifampicina (RA), en ausencia y presencia (estrella central) de 0,1 gramos de NaHS. B: CMI de cefotaxima (TX), determinada por E-test en una cámara estanca en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de 0,1 gramos de NaHS.

El fenotipo observado frente a estas cefalosporinas, ampliamente utilizadas terapéuticamente, resulta sumamente interesante desde una perspectiva clínica, pues, como hemos comentado, la resistencia que posee *Enterococcus* a este subgrupo de β -lactámicos conlleva que todo un grupo de antibióticos de necesidad crítica sean desechados para tratar infecciones por este patógeno nosocomial.

Al realizar nuestros experimentos observamos que la reversión de la resistencia por el H₂S no era común a todas las cefalosporinas, sino frente a unas específicas (Tabla 6): cefuroxima (CXM), cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CRO), cefpodoxima (CPD) y ceftizoxima (ZOX).

Tabla 6. Antibiogramas de *E. faecalis* V583 con diferentes cefalosporinas, en ausencia y presencia de 0,15 gramos de H₂S en una cámara estanca. La concentración de los discos está expresada en μ g. El tamaño de los halos está expresado en milímetros. Aquellas cefalosporinas frente a las que se produce la reversión de la resistencia aparecen subrayadas.

	TSB	H ₂ S 0,15 g
Cefaclor 30	10	13
Cefadroxil 30	13	13
Cefalexin 30	8	8
Cefalotina 30	16	16
Cefamandol 30	14	15
Cefazolina 30	14	16
Cefepime 30	13	15
Cefixime 5	6	6-16
<u>Cefotaxima 30</u>	6	21
Cefotetán 30	6	6
Cefoxitina 30	6	6
Cefpirome 30	22	25
<u>Cefpodoxima 10</u>	6	20
Cefprozil 30	21	23
Cefradine 30	12	13
Cefsulodina 30	6	6
Ceftazidima 30	6	~6
<u>Ceftizoxima 30</u>	6	16
<u>Ceftriaxona 30</u>	6	16
<u>Cefuroxima 30</u>	6	20

Estas cefalosporinas tienen en común un grupo metoxi-imino en su estructura (Figura 21), el cual potencia la capacidad del antibiótico para atravesar la membrana externa de las bacterias gram negativas y su estabilidad frente a β -lactamasas (Nikaido *et al.* 1990). Las cefalosporinas ceftazidima y cefixima presentan un grupo metoxi-imino modificado. Curiosamente, para estas dos últimas cefalosporinas no pudimos obtener resultados concluyentes en nuestro trabajo.

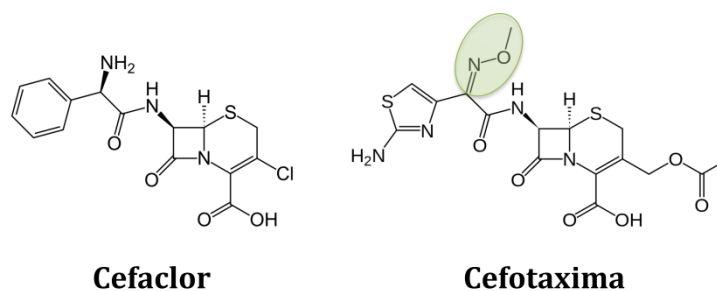


Figura 21. Estructura química de dos cefalosporinas, destacando el motivo metoxi-imino presente en algunas de ellas.

A continuación, decidimos testar en *E. faecalis* una gran batería de antibióticos de diferentes familias (Tabla 7). Para otros β -lactámicos, como penicilina y ampicilina¹⁰, el H_2S aumentó el halo exhibido por la bacteria en ausencia de H_2S , cuya relevancia discutiremos más adelante. En cambio, no modificó los halos de ertapenem o aztreonam.

Otro resultado de interés fue el aumento en la susceptibilidad generalizada que se produjo frente a todos los aminoglucósidos, familia de antibióticos para los que los enterococos muestran un bajo nivel de resistencia intrínseco. Esta línea, sobre la que discutiremos más adelante, no ha sido objeto de estudio en este trabajo, pero igualmente podría resultar interesante desde un punto de vista clínico.

¹⁰ También observamos un incremento del halo frente a amoxicilina, amoxicilina con ácido clavulánico e imipenem. No obstante, en *E. faecalis* la susceptibilidad a estos β -lactámicos puede inferirse a partir de la susceptibilidad a ampicilina ([CLSI] Clinical Laboratory Standards Institute 2017).

Frente al resto de los antibióticos testados, como son quinolonas/fluoroquinolonas, sulfamidas, tetraciclinas, vancomicina, rifampicina, clindamicina, cloranfenicol, etc. no observamos diferencias significativas al incubar en ausencia o presencia de H₂S.

Tabla 7. Antibiogramas de *E. faecalis* V583 con diferentes antibióticos, en ausencia y presencia de cantidades crecientes de H₂S en una cámara estanca. La concentración de los discos está expresada en µg. El tamaño de los halos está expresado en milímetros.

	TSB	H ₂ S 0,10 g	H ₂ S 0,15 g	H ₂ S 0,20 g
Ampicilina 10	28	39	>40	>40
Amoxicilina 25	33	>40	>40	>40
Amox. + Ac. clavulánico 30	32	40	>40	>40
Penicilina 10	24	29	30	38
Cefaclor 30	10	14	12	13
Cefotaxima 30	6	15	23	17
Ertapenem 10	6	6	6	6
Imipenem 10	29	33	37	38
Aztreonam 30	6	6	6	6
Amikacina 30	11	14	28	32
Apramicina 15	6	14	23	26
Estreptomicina 10	6	11	24	26
Gentamicina 10	13	20	27	30
Kanamicina 30	11	15	28	40
Neomicina 30	10	20	24	28
Tobramicina 10	11	18	28	32
Ácido nalidíxico 30	6	6	6	6
Norfloxacina 10	23	23	25	26
Sulfametoxazol 300	6	6	6	6
Sulfa - Trimetoprim 25	33	33	34	30
Tetraciclina 30	30	31	33	32
Clindamicina 2	6	6	6	6
Cloranfenicol 50	29	32	30	33
Colistina 10	6	6	6	6
Eritromicina 15	23	27	29	30
Ácido fusídico 5	13	21	19	16
Lincomicina 15	7	10	9	8
Mupirocina 5	8	10	11	10
Pristinamicina 15	17	19	18	17
Rifampicina 5	18	19	19	20
Vancomicina 30	15	18	19	20

A la hora de estimar qué concentración de H₂S parecía más adecuada para futuros experimentos, observamos que V583 crecía de forma óptima al colocar entre 0,1 y 0,15 gramos de NaHS dentro del recipiente, aunque era capaz de crecer hasta con 0,2 gramos. En cualquier caso, para la mayoría de los antibióticos no había diferencias en los halos entre una cantidad y otra.

En cambio, la cepa JH2-2 es más sensible y cantidades superiores a 0,1 gramos afectaron o directamente impidieron su crecimiento. Curiosamente, encontramos que 0,05 o 0,01 gramos afecta de forma igualmente negativa al crecimiento de los enterococos.

Además, también comprobamos la existencia de esta sinergia cefalosporinas-H₂S en *Enterococcus faecium* (Figura 22), la otra especie de relevancia clínica dentro del género *Enterococcus*. Este resultado refuerza mucho más la importancia de nuestro trabajo.

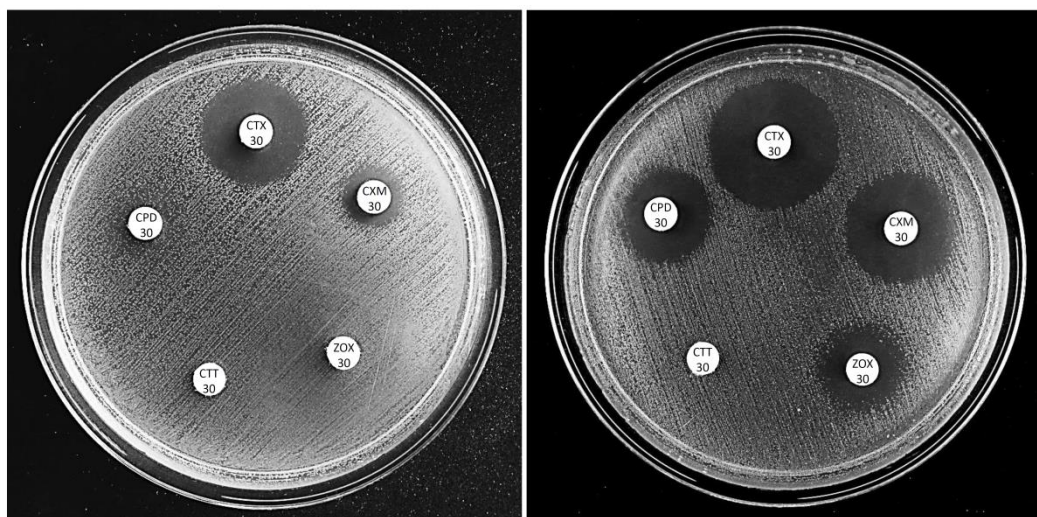


Figura 22. Antibiogramas de *E. faecium* incubados en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de H₂S 0,15 gramos, para los antibióticos cefotaxima (CTX), cefuroxima (CXM), ceftizoxima (ZOX), cefotetán (CTT) y cefpodoxima (CPD).

Posteriormente, decidimos determinar, mediante la técnica de microdilución en placa, la concentración mínima inhibitoria en presencia de diferentes cantidades de NaHS. Este método nos inspiraba inicialmente menos confianza por el hecho de tener que incubar las bacterias con NaSH (que, como ya hemos comentado, presenta un alto nivel de impurezas), además de que la vida media de este compuesto es también muy reducida, por lo que es difícil calcular con precisión las concentraciones utilizadas. Aun así, obtuvimos unos resultados consistentes (la media de las tres repeticiones puede encontrarse en la Tabla 8) y acordes a la CMI determinada mediante E-test. Yendo más allá, esta técnica nos permitió hacernos una idea, muy general, de qué concentración de H₂S gaseoso podría alcanzarse en la cámara estanca en la que realizamos los antibiogramas y E-tests previamente mostrados. Aproximamos que dicha concentración se situaría en una horquilla entre 200 y 400 µM, dado que a esta concentración el nivel de susceptibilidad observado en las CMIs fue similar al observado en los E-tests.

Tras obtener estos resultados para *E. faecalis* y *E. faecium*, específicos para determinados antibióticos, nos interesamos en conocer si el mismo fenómeno ocurría en especies resistentes a cefalosporinas relativamente cercanas a *Enterococcus*, como son *L. ivanovii* y *S. aureus* MRSA COL (Archer *et al.* 1994). Sin embargo, la primera no fue capaz de crecer en un rango de 0,01 a 0,1 gramos de NaSH en la cámara, mientras que la segunda no mostró ningún cambio en el patrón de resistencia a antibióticos, además de mostrar un crecimiento peor que el de *Enterococcus*.

Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/L) de *E. faecalis* JH2-2 WT frente a cefotaxima (una cefalosporina con grupo metoxi-imino) y cefaclor (sin grupo metoxi-imino).

[H ₂ S] μM	Cefotaxima	Cefaclor
0	>128	32
100	>128	32
200	2-4	32
400	<0.25-0.50	32

1.3. Curvas de crecimiento de *E. faecalis*

Tras los resultados obtenidos en medio sólido, llevamos a cabo curvas de crecimiento en medio líquido TSB para ver si se producía el mismo efecto sinérgico entre H₂S y la metoxi-imino cefalosporina cefotaxima (CTX), sembrando diluciones a las 12 y 24 horas (Figura 23). Aunque *E. faecalis* es resistente a las cefalosporinas, el crecimiento que alcanzaron las bacterias en presencia de cefotaxima 8 mg/L fue sensiblemente menor que en ausencia de antibiótico (*t* de Student, $P = 0,002$, $t = 2,35$, g.l. = 3). Observamos que el crecimiento en presencia de H₂S 250 μM es análogo al alcanzado con CTX (*t* de Student, $P = 0,11$, $t = 2,92$, g.l. = 2) y, por tanto, también algo menor al de la bacteria silvestre (*t* de Student, $P = 0,002$, $t = 2,01$, g.l. = 5). A las 24 horas los resultados estadísticamente significativos fueron equivalentes.

En cambio, la combinación de H₂S con CTX no solo no permitió que la bacteria creciera a las 12 o a las 24 horas, sino que el número de UFC en ambos casos fue significativamente menor que a las 0 horas (*t* de Student, $P = 0,01$, $t = 2,01$, g.l. = 5). Como es ya esperable, el crecimiento de la muestra con H₂S y CTX también fue estadísticamente diferente respecto al exhibido por el control (*t* de Student, $P = 0,001$, $t = 2,35$, g.l. = 3), la muestra con H₂S (*t* de Student, $P = 0,046$, $t = 2,91$, g.l. = 2) y la muestra con CTX (*t* de Student, $P = 0,01$, $t = 2,35$, g.l. = 3).

Por tanto, la combinación de CTX con H₂S tiene un efecto sinérgico estadísticamente significativo.

Aunque no aparecen aquí reflejadas, también realizamos curvas de crecimiento preliminares con cefaclor, una cefalosporina sin grupo metoxi-imino, y con ácido nalidíxico, una quinolona frente a la que *E. faecalis* es resistente, mostrando JH2-2 el mismo nivel de crecimiento que la cepa silvestre, lo cual indica, de nuevo, que el efecto sinérgico de H₂S se produce exclusivamente con algunas cefalosporinas.

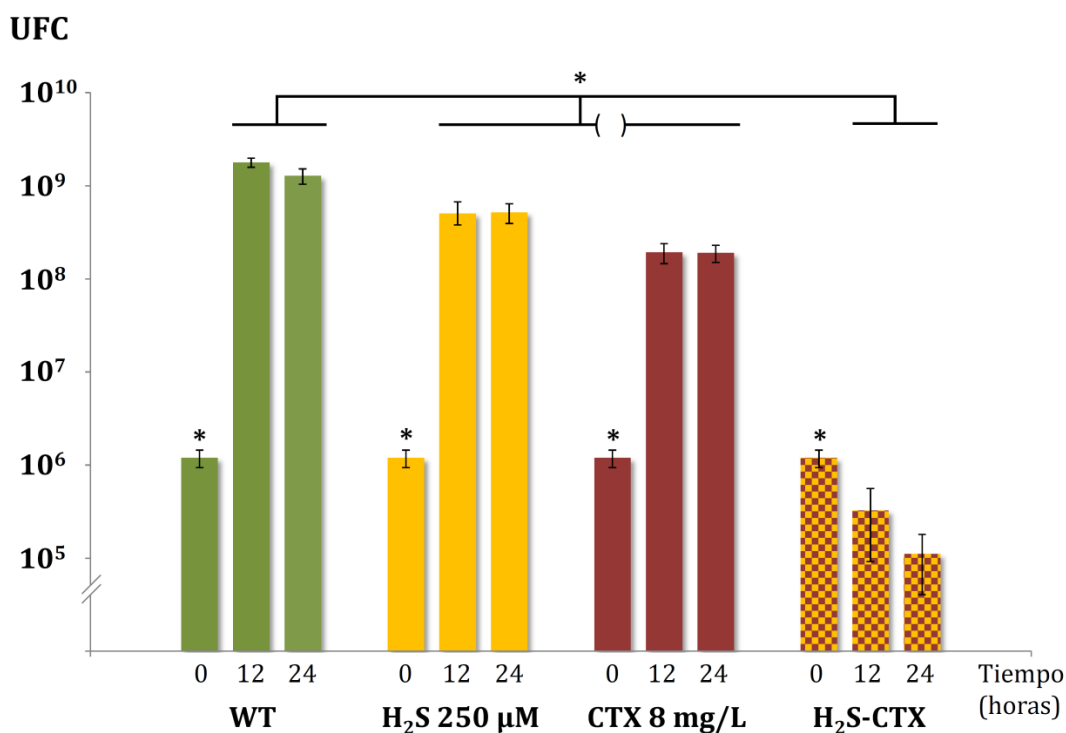


Figura 23. Medias de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) a las 0, 12 y 24 horas de crecimiento de *E. faecalis* JH2-2 WT en condiciones normales (en TSB), en presencia de H₂S 250 μM o cefotaxima (CTX) 8 mg/L por separado, o en presencia de ambos compuestos. Cada valor se determinó, al menos, en tres experimentos independientes. Las barras de error muestran el error estándar.

II. Fisiología del H₂S en *Salmonella Typhimurium*

Tras realizar varios experimentos que corroboraban que *Enterococcus* pierde su resistencia intrínseca a cefalosporinas en presencia de H₂S, nos planteamos si esto también ocurriría en un contexto biológico. Incluso se ha afirmado que los donadores químicos de H₂S, como son NaSH o Na₂S, no reflejan una situación biológica dado que producen una rápida liberación de H₂S que alcanza concentraciones iniciales tóxicas para luego reducirse drásticamente (Papapetropoulos 2015).

Por ello, buscamos una fuente biológica de producción de H₂S para nuestros experimentos y contactamos con el equipo de Evgeny Nudler (Shatalin *et al.* 2011), que cordialmente nos cedió las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en su estudio (Tabla 3), es decir, la cepa silvestre MG1655 con el gen *sseA* (vía MST) para producir H₂S, el mutante de delección Δ MST y el mutante con dicho gen sobreexpresado (pMST).

Sin embargo, las comprobaciones que hicimos para comparar la producción de H₂S no mostraron diferencias entre las tres cepas. Por un lado, incubamos cada cepa en medio Kligler, pero no observamos pigmentación en ningún caso (Figura 27). Por otro lado, inoculamos las cepas en medio LB y en agua peptonada para determinar la producción de H₂S con tiras de acetato de plomo, utilizando como control la cepa *Salmonella Typhimurium* ATCC14028 sugerida por la casa comercial (Sigma-Aldrich Química SA, España). Aunque observamos cierta producción de H₂S en *E. coli* y sus mutantes, no fuimos capaces de observar las diferencias afirmadas por los autores,

es decir, una producción un 40% mayor en el mutante *pMST* y un 90% menor en el mutante Δ *MST*, en comparación con la cepa WT (Tabla 9).

Tabla 9. Nivel de producción de H₂S, por *Escherichia coli* MG1655 WT y sus mutantes H₂S- (Δ *MST*) y H₂S+ (*pMST*), medido a cada hora utilizando como escala de producción la Figura 17. *S. Typhimurium* y *L. ivanovii* se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

Tiempo (horas)	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i> WT	<i>E. coli</i> Δ <i>MST</i>	<i>E. coli</i> <i>pMST</i>	<i>L. ivanovii</i>
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	2	0-1	1	0-1	0
4	2-3	1	2	0-1	0
5	3	1	2-3	1	0
6	4	1	2-3	1	0
7	4-5	1-2	2-3	1-2	0
8	4-5	2	2-3	1-2	0
24	4-5	2	2-3	2	0

2.1. Caracterización de la producción de H₂S en *Salmonella Typhimurium*

Por lo anterior, decidimos trabajar con la bacteria *Salmonella Typhimurium* ATCC14028, mencionada unas líneas más arriba. La producción de H₂S por esta especie fue caracterizada hace décadas. A día de hoy, se sabe que puede producirlo mediante dos vías diferentes: la asimilatoria, basada en la reducción de sulfato a H₂S para incorporarlo posteriormente a cisteína y otras moléculas orgánicas poseedoras de azufre; y la disimilatoria, basada en la reducción de tiosulfato a H₂S y cuya función biológica no está aclarada.

La producción disimilatoria de H₂S se realiza principalmente a través del operón *phsABC*. Para este trabajo deletamos completamente dicho operón (Figura 24) mediante una técnica que conserva el marco de lectura, previamente descrita (Datsenko & Wanner 2000; Baba *et al.* 2006). Después, comprobamos mediante dos técnicas diferentes que la producción de H₂S quedaba totalmente abolida en el mutante Δ *phs*.

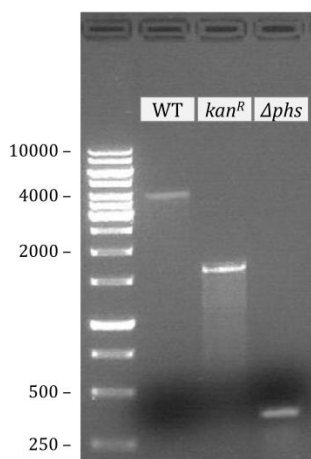
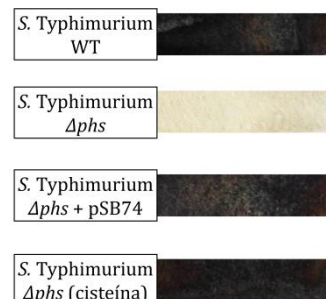


Figura 24. PCRs realizadas con dos cebadores que hibridan en las inmediaciones del operón *phsABC* de *S. Typhimurium*, para las cepas silvestre (WT), mutante cuyo operón ha sido sustituido por el cassette de resistencia a kanamicina (*kan^R*) y mutante con el operón deletado *in frame* (Δphs).

Figura 25. Detección por tiras de $Pb(Ac)_2$ de la producción de H_2S , en agua peptonada, para las cepas de *S. Typhimurium wild-type* (WT), el mutante Δphs , Δphs complementado con pSB74 y Δphs en un medio suplementado con cisteína.



Por un lado, colocamos tiras de acetato de plomo por encima de inóculos líquidos en agua peptonada. La diferencia entre ambas cepas fue radical (Figura 25).

Por otro lado, inoculamos en medio Kligler, observando el mismo fenotipo (Figura 27). Ante la posibilidad de que en el medio Kligler se estuviera creando una situación de anaerobiosis, repetimos el experimento con el tubo abierto, obteniendo el mismo resultado. También realizamos el experimento añadiendo tiosulfato (T-S) adicional al medio, pero obtuvimos los mismos resultados.

Además, hemos comprobado que en el medio Kligler no se observan los primeros indicios de producción de H_2S hasta las 4 horas de incubación, por lo que esta técnica parece algo menos sensible que las tiras de acetato, cuya detección ocurre una hora antes (Tabla 9).

Por último, complementamos el mutante Δphs con el plásmido pSB74, el cual contiene el operón *phs* íntegro, comprobando que se recuperaba la producción de H_2S al mismo nivel que la cepa WT. También transformamos la cepa con el plásmido pTrc99a (el vector pSB74 vacío) como control.

No obstante, el mutante Δphs de *S. Typhimurium* también debería producir H_2S por la vía asimilatoria. Como fenotípicamente no parece la situación, decidimos añadir cisteína, el sustrato de la vía asimilatoria, al medio y comprobamos que entonces sí, la cepa producía de H_2S de nuevo (Figura 25). Por tanto, demostramos que, en condiciones basales, la única vía de excreción de H_2S activa en *S. Typhimurium* es la vía PHS.

2.2. Influencia del H_2S en el crecimiento y en la resistencia a antibióticos de *Salmonella Typhimurium*

A continuación, quisimos comprobar si el nivel de crecimiento o la resistencia a antibióticos de *S. Typhimurium* se veía afectada por la delección del operón *phs*, partiendo de los estudios realizados por otros autores en esta especie (Álvarez, Neumann, *et al.* 2015; Frávega *et al.* 2016) o en otras bacterias (Shatalin *et al.* 2011).

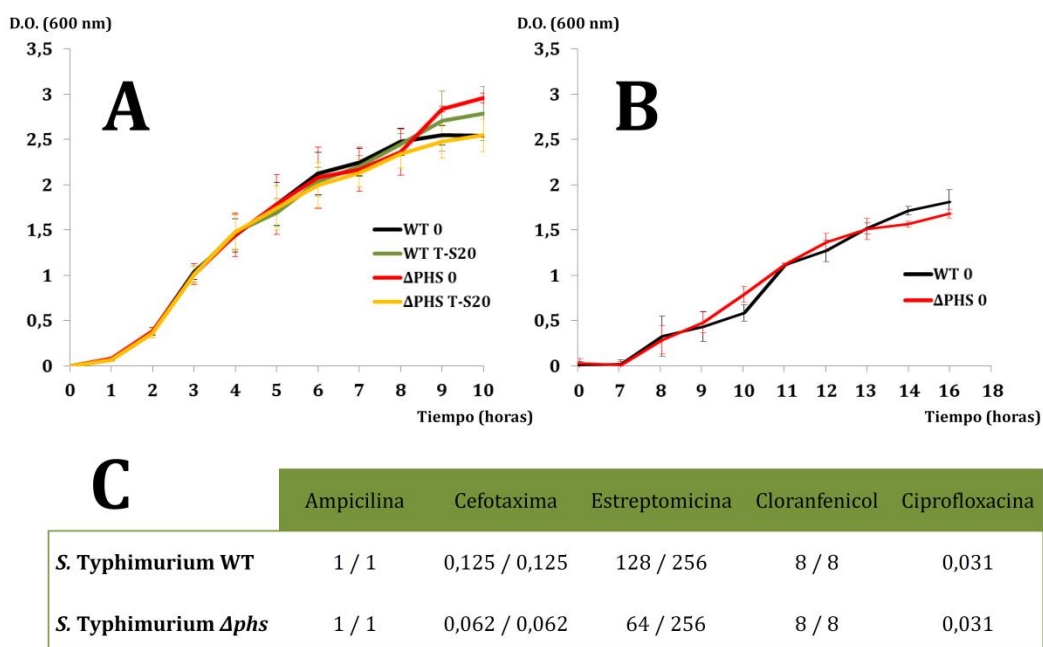


Figura 26. A. Crecimiento la cepa silvestre (WT) y del mutante Δphs de *S. Typhimurium*, tanto en ausencia como en presencia de T-S 20 mM. B. Crecimiento de *S. Typhimurium* WT y Δphs en presencia de ampicilina 0,5 mg/l. Las barras de error muestran el error estándar. C. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (mg/L) determinadas en ausencia / presencia de T-S 20 mM. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Sin embargo, ninguno de los experimentos realizados (Tabla S2, Figura 26) mostró diferencias entre la cepa silvestre y Δphs , ni siquiera al añadir T-S para aumentar la producción de H_2S .

Sí hay que mencionar que tanto los experimentos en líquido como los antibiogramas muestran un ligero incremento de la resistencia a los aminoglucósidos en presencia de tiosulfato, aunque esto ocurre tanto para la cepa silvestre como para el mutante no productor de H_2S .

2.3. Producción de H_2S por *E. coli* a partir del operón de *S. Typhimurium*

Una vez que caracterizamos la fisiología del operón *phs* en su especie de origen, nos interesamos en saber su funcionalidad en otra especie, así que transformamos el plásmido pSB74, conteniendo el operón *phsABC* de *S. Typhimurium*, en *E. coli* MG1655, tanto la cepa silvestre como el mutante ΔMST .

Hemos comprobado por medio Kligler que ambas bacterias conteniendo el operón producen H_2S , como también evidenciaron Bang y colaboradores para la cepa DH5 α (Bang *et al.* 2000). Nos resultó sorprendente observar que el nivel de producción de H_2S en *E. coli* parece significativamente menor al producido por *S. Typhimurium* (Figura 27).

Por otro lado, como también comentamos anteriormente, no hemos encontrado diferencias en la producción de H_2S entre WT y ΔMST , ni tampoco en cuanto a la resistencia a antibióticos entre *E. coli* WT, ΔMST y las cepas productoras de H_2S (Tabla S3).

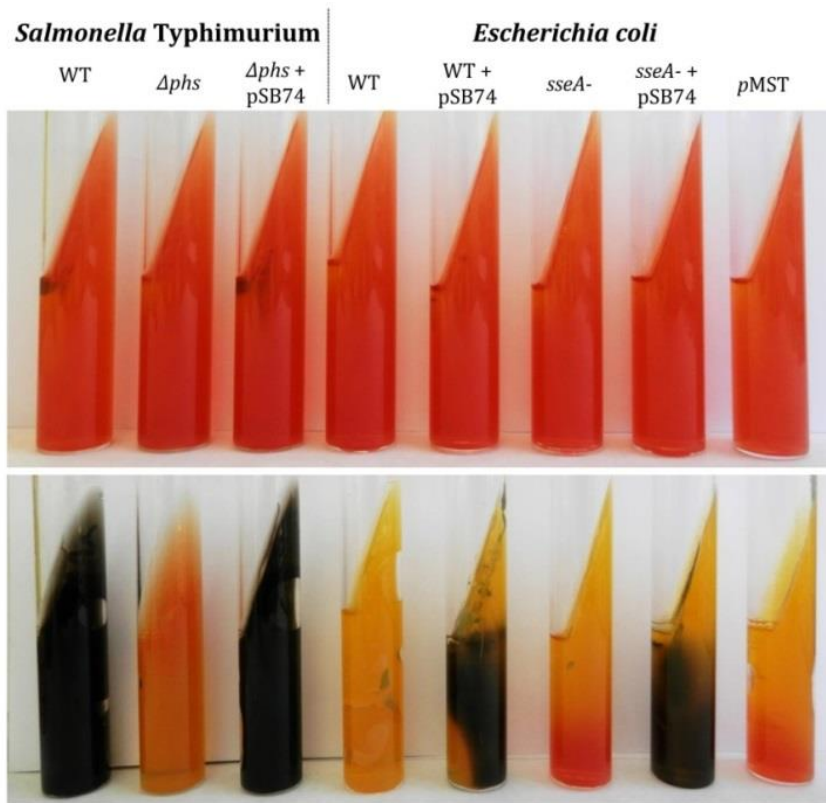


Figura 27. Producción de H₂S en medio Kligler a las 4 horas (fila superior) y 20 horas (fila inferior).

III. Interacción entre *Salmonella* y *Enterococcus*

3.1. Reversión de la resistencia a cefalosporinas de *E. faecalis* por *S. Typhimurium*

Sabiendo que el ácido sulfhídrico de origen químico es capaz de revertir la resistencia a cefalosporinas de *Enterococcus*, nos interesamos en observar si ocurre lo mismo cuando *E. faecalis* se ve expuesto al H₂S producido por otra bacteria, en nuestro caso, *S. Typhimurium*. Además, esto nos permitiría corroborar que el responsable del fenotipo no es ningún otro metabolito volátil secundario presente en NaHS.

Como es necesario incubar *E. faecalis* al mismo tiempo con cefotaxima y con H₂S, pero *S. Typhimurium* es sensible a cefalosporinas, ambas cepas no pueden crecer en el mismo medio. Así que diseñamos un sistema en el que el H₂S producido por una bacteria pudiera actuar a distancia sobre otra. A este método lo denominamos enfrentamiento. Consiste en hacer un antibiograma de la cepa a testar y sembrar del mismo modo en otra placa *S. Typhimurium*, pero sin colocar ningún disco de antibiótico (ver Materiales y Métodos para más detalles). Para aumentar la producción de H₂S por *Salmonella*, añadimos el sustrato de la vía PHS, tiosulfato, al medio, como aparece en otros estudios (Bang *et al.* 2000).

Así, pudimos comprobar que, efectivamente, *S. Typhimurium* WT es capaz de inducir la susceptibilidad a cefalosporinas en *E. faecalis* JH2-2, lo que no ocurre al enfrentar JH2-2 con la cepa Δphs (Figura 28). En cambio, observamos que la cepa V583 apenas presentaba halos aumentados frente a las cefalosporinas al ser enfrentada contra *S. Typhimurium*. Teniendo en cuenta nuestros resultados previos que mostraban una

mayor resistencia de esta cepa al H₂S, es probable que esta ausencia de inducción se deba a que la cantidad de H₂S producida por *S. Typhimurium* sea menor a la liberada por NaHS.

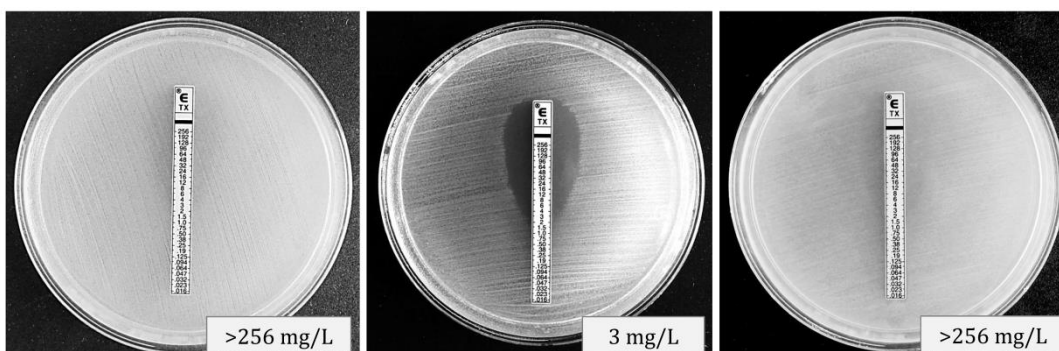


Figura 28. CMI de *E. faecalis* JH2-2: cepa no enfrentada (izquierda), enfrentado a *Salmonella* Typhimurium WT (centro) y a *S. Typhimurium* Δphs (derecha).

3.2. Reversión de la resistencia a cefalosporinas de *E. faecalis* por una cepa de *E. coli* productora de H₂S

Sabiendo que el operón *phs* de *S. Typhimurium* es funcional en *E. coli*, quisimos comprobar si dicha cepa es capaz igualmente de inducir la susceptibilidad a cefalosporinas en JH2-2, por lo que realizamos enfrentamientos del mismo modo y observamos que así ocurría, tanto en el caso de la cepa WT como del mutante ΔMST de *E. coli*, ambas poseedoras del operón *phs* (

Tabla 10).

Tabla 10. Antibiogramas de JH2-2 WT enfrentados contra diferentes cepas de *E. coli*, sembradas estas en TSA+T-S 20 mM. El tamaño del halo de inhibición está expresado en milímetros.

	K	CTX	CXM	CEC
Control	10	6	6	15
vs. <i>S. Typhimurium</i> WT	14	30	23	21
vs. <i>E. coli</i> WT	12	6	6	17
vs. <i>E. coli</i> WT + pSB74	15	24	16	12
vs. <i>E. coli</i> ΔMST	11	6	6	17
vs. <i>E. coli</i> ΔMST + pSB74	13	15	21	9

3.3. Interacción de *S. Typhimurium* con otras especies

Como vimos anteriormente que *L. ivanovii* y MRSA COL no crecían óptimamente en presencia de H₂S de origen químico, realizamos enfrentamientos de *S. Typhimurium* contra estas especies. Además, realizamos enfrentamientos para observar si el H₂S

producido por *S. Typhimurium* influye en el nivel de crecimiento en placa, la morfología de las colonias o la actividad hemolítica de las bacterias anteriores o de *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris* y el propio mutante *S. Typhimurium Δphs*.

Incluso en ausencia de tiosulfato, *L. ivanovii* presentó un crecimiento pobre. MRSA presentó un crecimiento óptimo pero sin cambios en el perfil de resistencia. *B. cereus*, *P. vulgaris* y el mutante *Δphs* crecieron al mismo nivel que los controles, pero no observamos ninguna diferencia para los diferentes fenotipos muestreados.

3.4. Enfrentamientos en anaerobiosis

Realizamos los enfrentamientos en ausencia de oxígeno para testar una vez más si nuestro fenotipo podría estar relacionado con un aumento del estrés oxidativo al combinar H₂S y cefalosporinas. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron los mismos que en aerobiosis (Tabla 11).

Tabla 11. Enfrentamientos de *E. faecalis* JH2-2 WT (en medio TSA) contra *S. Typhimurium* (en medio TSA con T-S 20 mM), para los antibióticos apramicina (APR), cefotaxima (CTX), cefpodoxima (CPD) y cefaclor (CEC). El tamaño de los halos está expresado en milímetros.

	Aerobiosis				Anaerobiosis			
	APR	CTX	CPD	CEC	APR	CTX	CPD	CEC
Control	9	6	6	15	12	6	6	18
vs. <i>S. Typhimurium</i> WT	11	24	19	17	16	26	22	19
vs. <i>S. Typhimurium Δphs</i>	8	6	6	12	10	6	6	14

IV. Análisis proteómico y genético de *Enterococcus* en presencia de H₂S

Para identificar el mecanismo que conlleva en *Enterococcus* la pérdida de la resistencia a cefalosporinas mediada por el H₂S, llevamos a cabo diferentes experimentos.

4.1. Mutagénesis espontánea

Inicialmente, en dos experimentos diferentes se intentó obtener mutantes espontáneos de la cepa V583 que fueran capaces de crecer en presencia de NaHS 0,1 gramos junto con un rango de concentraciones de cefotaxima desde 16 hasta 256 mg/L. Sin embargo, por este método no obtuvimos ni una sola colonia, aunque las placas fueran incubadas hasta 48 horas.

También intentamos aislar colonias resistentes sembrando el pellet de un inóculo O/N de JH2-2 WT en una placa de TSA + CTX 16 mg/L e incubándola con NaHS 0,1 gramos. Sin embargo, de este experimento realizado dos veces solo obtuvimos una colonia que, aunque el antibiograma inicial no mostraba ningún halo frente a CTX, en posteriores experimentos sí lo observamos, por lo que no seguimos trabajando con ello.

Así que, a continuación, sembramos V583 por inundación en una placa de TSA conteniendo un gradiente de cefotaxima desde 0 hasta 256 mg/L y la incubamos en presencia de NaHS 0,1 gramos. A las 24 horas pudimos observar el crecimiento de unas 100 colonias en el extremo de CTX 0 mg/L, mientras que una placa sembrada

de igual manera sin H₂S presentaba un tapiz en toda la placa. De ellas, seleccionamos las 8 colonias más alejadas y, basados en su perfil de resistencia, secuenciamos tres de ellas.

4.1.1. Análisis de genomas

Al analizar los datos con el software Geneious (Kearse *et al.* 2012) localizamos dos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) compartidos por los tres mutantes respecto a la cepa WT. De ellos, sólo uno produce una mutación no sinónima. La región en la que se sitúa el nucleótido afectado corresponde al gen EF2466 (Número de acceso en GenBank NC_004668.1) (Clark *et al.* 2016), conllevando un cambio en la proteína que codifica de ácido glutámico (“E”), en la cepa silvestre, a lisina (“K”) en los mutantes (Figura 29).

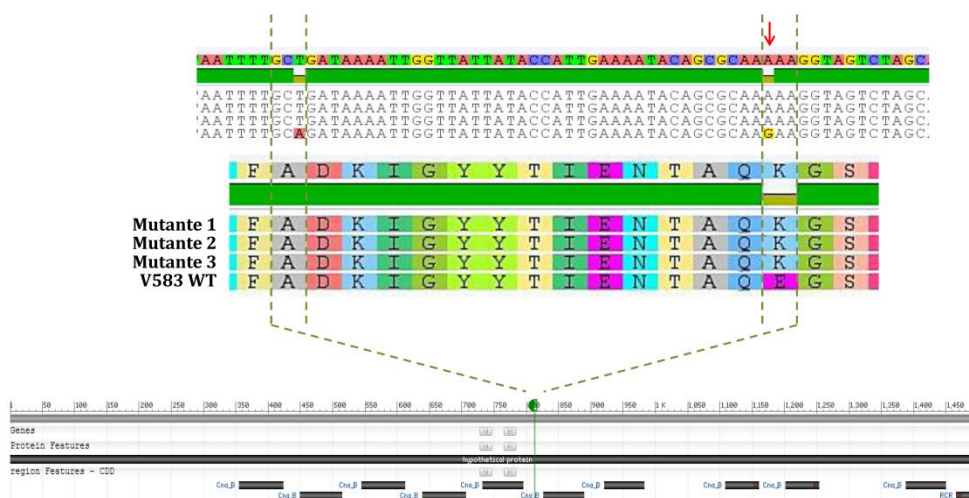


Figura 29. Secuencias nucleotídica y aminoacídica de *E. faecalis* V583 y de los mutantes espontáneos resistentes a H₂S-cefotaxima. Aparecen destacadas la mutación sinónima (en rojo) y la no sinónima (en amarillo, con una flecha roja encima). La secuencia aminoacídica completa del gen puede encontrarse en el Anexo 2.2.

Este gen EF2466, cuya proteína cuenta con tres cisteínas en su estructura, codifica para una proteína hipotética. De acuerdo al NCBI (*National Center*

for Biotechnology Information), dicha proteína cuenta con una serie de regiones repetidas similares a las encontradas en la proteína de membrana para la adhesión al colágeno de *Staphylococcus aureus* (Deivanayagam *et al.* 2000), aunque V583 no parece contar con la secuencia completa para codificar esta proteína. En nuestras cepas, la mutación se localiza en una región situada entre dichos dominios repetidos. Más adelante discutiremos en mayor profundidad sobre este mutante.

4.2. Mutagénesis por transposición aleatoria

Mediante esta técnica, consistente en transformar en la bacteria un plásmido portador de un transposón y después inducir la inserción de dicho transposón en el genoma de su hospedadora, obtuvimos una serie de mutantes de la cepa JH2-2, los cuales inicialmente mantenían su resistencia a cefotaxima al ser expuestos al H₂S producido por *S. Typhimurium*. Sin embargo, cuando posteriormente seguimos trabajando con ellos las cepas volvieron a mostrar susceptibilidad a la combinación de ambos compuestos, por lo que no se siguieron analizando.

Proveniente de otro experimento por transposición previo a este trabajo sí que identificamos un mutante, *pyr*-, cuyo fenotipo de resistencia frente a CTX-H₂S era consistente y constante. Identificamos que en dicho mutante el transposón se encontraba insertado delante del gen *pyrR* (EF1721), el regulador negativo del operón *pyr* para la síntesis de pirimidinas. Este operón cuenta con un complejo sistema de autorregulación que comentaremos más adelante.

4.3. Caracterización preliminar de la sulfhidrilación interna de proteínas

Partiendo de que la mayoría de los artículos publicados afirman que el H₂S actúa postraduccionalmente, modificando los residuos tiol (-SH) de determinadas cisteínas en proteínas concretas, decidimos analizar el patrón de sulfhidrilación de *E. faecalis* en nuestros experimentos.

Para ello, utilizamos una técnica desarrollada por el equipo de Milos Filipovic y consistente en el marcaje de los residuos persulfuros (los residuos de cisteína que han reaccionado con el H₂S) con una sonda fluorescente específica para dichos residuos. Después, las proteínas extraídas se analizan por SDS-PAGE.

Así, hemos realizado las siguientes observaciones (Figura 30), cuya consideración desde un punto de vista estadístico será discutida posteriormente:

- En primer lugar, hemos visto que en condiciones basales ya existe cierta sulfhidrilación de diferentes proteínas, y que este nivel de sulfhidrilación varía significativamente al añadir distintos compuestos (Análisis de la varianza de un factor ANOVA, $\alpha = 0,05$; $P = 0,01$; $F = 5,69$; *grados de libertad* = 4, 9) (Ver Anexo III: Tabla S6 y Tabla S7).
- Al incubar las muestras con H₂S, esperábamos encontrar un incremento considerable de la sulfhidrilación con respecto al nivel basal. Sin embargo, aunque el aumento observado no fue significativo al analizarlo estadísticamente con el test post-hoc LSD (*Least Significant Difference*), sí que apreciamos cierta tendencia. Del mismo modo, las muestras incubadas con cefotaxima presentaron una disminución aparente del nivel de sulfhidrilación, aunque esto tampoco pudimos apoyarlo estadísticamente.

- En cambio, al incubar con cefaclor, una cefalosporina sin grupo metoxi-imino y que, por tanto, no presenta efecto bactericida sinérgico con el H₂S, el nivel de fluorescencia observado fue significativamente mayor que el exhibido tanto por la muestra WT como en presencia de CTX.

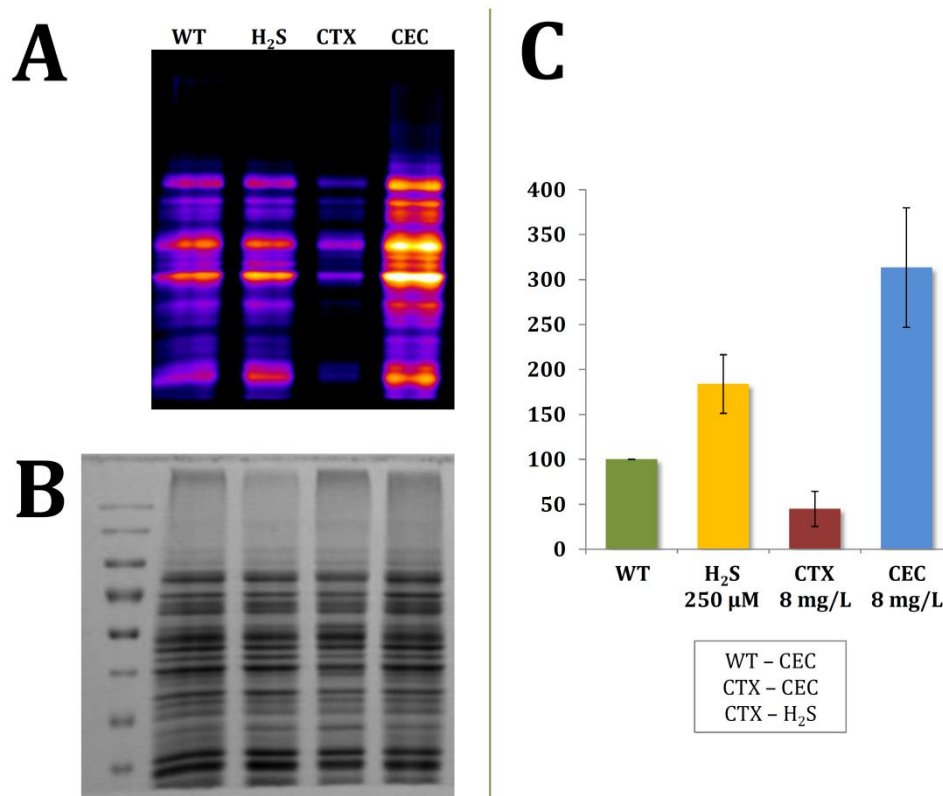


Figura 30. A. Fluorescencia emitida por las diferentes muestras. B. Visualización del total de proteína presente en el mismo experimento. C. Porcentaje de fluorescencia emitida por cada muestra en relación a la muestra WT, fijada como 100%; cada resultado se ha normalizado respecto de la concentración proteica de dicha muestra. Muestra control (WT) o WT incubada con H₂S 250 μM (H₂S), cefotaxima 8 mg/L (CTX), cefaclor 8 mg/L (CEC), cefaclor+H₂S (CEC+H₂S). El experimento se realizó por triplicado salvo en el caso de CEC+H₂S, en el que solo se contó con dos mediciones. Las barras de error muestran el error estándar. En la parte inferior se indican los pares de medias estadísticamente diferentes.

- La observación global más destacable de estos experimentos es que la sulhidrilación de *E. faecalis* JH2-2 incubada con H₂S o con cefaclor fue significativamente mayor que la resultante al incubar la cepa con cefotaxima.

- En ningún caso parece alterarse el patrón de expresión proteica, por lo que podríamos confirmar que el H₂S actúa a nivel postraducciona.

4.4. Análisis *in silico* de proteínas implicadas en la reversión de la resistencia a cefalosporinas en *Enterococcus* y susceptibles de ser modificadas por el H₂S

Tras los experimentos anteriores, realizamos un análisis de aquellos genes de *Enterococcus* que han sido conectados con la resistencia a cefalosporinas u otros agentes cercanos y que presentan alguna cisteína en su secuencia aminoacídica, para tratar de identificar los posibles genes responsables de nuestro fenotipo.

En el Anexo II (Tabla S4 y Tabla S5) se resumen dichos genes, destacando especialmente aquellas cisteínas que se encuentran dentro de la secuencia codificante de los genes. En la discusión los analizaremos y comentaremos cuáles de ellos es más probable que estén relacionados con la pérdida de la resistencia a cefalosporinas en *Enterococcus*.

DISCUSIÓN

No es lo mismo encontrar algo, que encontrar algo, preocuparse por ello, investigarlo y explicarlo.

Francisco JM Mojica
SEM@foro, Junio 2016

I. Efecto del H₂S sobre diferentes bacterias y sobre la resistencia a antibióticos en *Enterococcus*

1.1. Tolerancia de las bacterias al H₂S

Inicialmente quisimos observar si el H₂S modificaba el perfil de resistencia a antibióticos, como demostraron Shatalin *et al.* en el año 2011 para algunas bacterias. Así, realizamos antibiogramas de diferentes especies en presencia de H₂S. Para la mayoría de ellas, no observamos diferencia en su perfil de antibiorresistencia, pero sí en el de tolerancia al propio H₂S. Este compuesto es una sustancia tóxica y, como tal, es de esperar que afecte al crecimiento de los organismos, pero hemos observado que la concentración a la que esto ocurre varía considerablemente. Hay especies como *Listeria ivanovii* o *Haemophilus influenzae* que mostraron ser extremadamente sensibles. *Enterococcus* presenta una tolerancia intermedia. En cambio, otras, como las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, toleran el H₂S a concentraciones mucho más elevadas. Esto tiene sentido al considerar el ambiente en el que viven las diferentes bacterias, pues la luz del tracto digestivo es un lugar donde el H₂S es abundante en comparación con otros nichos, por lo que es lógico que las Enterobacterias sean las más resistentes de las cepas testadas y que *Enterococcus*, hospedador frecuente pero en pequeña proporción, presente también cierta tolerancia.

Un apartado que requiere más estudio es por qué *Enterococcus* se ve más afectado por el H₂S al reducir la concentración del mismo. A bajas concentraciones, en teoría el H₂S puede utilizarse como aceptor de electrones y, por tanto, esto debería

estimular su crecimiento (Módís *et al.* 2013). La capacidad de *E. faecalis* para crecer a ciertas concentraciones pero no a otras más bajas recuerdan al efecto Eagle producido por ciertos antibióticos, consistente precisamente en este fenómeno y visualizado en un antibiograma como un halo con una zona de crecimiento adyacente al disco.

1.2. Perfil de resistencia de *Enterococcus* en presencia del H₂S

1.2.1. Efecto sinérgico del H₂S con las cefalosporinas

Obviamente, el fenotipo de mayor interés fue el que observamos en el perfil de resistencia a antibióticos de *Enterococcus faecalis*. Los enterococos son intrínsecamente resistentes a cefalosporinas, lo que clínicamente implica que toda esta familia de antibióticos, considerada de necesidad crítica por la OMS, es descartada de base para tratar infecciones por este patógeno. En el caso de cepas “clásicas” de *E. faecalis* y *E. faecium*, sin mecanismos de resistencia adicionales adquiridos, existen diferentes alternativas terapéuticas disponibles. Sin embargo, teniendo en cuenta la alta plasticidad del genoma de *Enterococcus* y su relativa facilidad para desarrollar o captar mecanismos de resistencia, en multitud de ocasiones existe un número muy limitado de tratamientos al alcance. Si a esto se le suma el riesgo de disbiosis intestinal e infección enterocócica secundaria a un tratamiento con cefalosporinas, es fácil de entender el enorme valor clínico que supondría la posibilidad de revertir la resistencia a cefalosporinas de *E. faecalis* y *E. faecium*. De hecho, como ya hemos mencionado, la OMS ha clasificado muy recientemente a *E. faecium* resistente a vancomicina entre los patógenos frente a los que existe una prioridad elevada de búsqueda de nuevos antibióticos (Tacconelli *et al.* 2017).

Sin embargo, los mecanismos implicados en la resistencia a cefalosporinas en este patógeno son mucho más intrincados de lo que se asumió inicialmente. Si a finales del siglo XX se creía que se debía únicamente a la presencia de la PBP5, hoy en día se han identificado una decena de genes involucrados y, lo que resulta aún más enigmático, ninguno de ellos parece ser la causa final, pues los autores siguen apuntando en sus conclusiones a “factores no descritos” para conectar sus resultados con los conocimientos ya establecidos.

Más interesante todavía es que la mayoría de los artículos apuntan a una vía común, puesto que los resultados presentados generalmente hacen referencia a las mismas cefalosporinas, al igual que ocurre con nuestros experimentos, que parecen estar relacionados principalmente con las metoxi-imino cefalosporinas.

En base a nuestras observaciones, podríamos catalogar dichas cefalosporinas en tres grupos:

- Cefalosporinas con grupo metoxi-imino clásico: cefuroxima (de 2ª generación), cefotaxima, ceftriaxona, ceftizoxima y cefpodoxima (todas de 3ª generación). *E. faecalis* muestra en los antibiogramas una resistencia completa a las cinco y para todas ellas se produce una reversión de la resistencia en presencia de H₂S. En el caso de *E. faecium*, la ausencia de halo solo se produce para ceftizoxima y cefpodoxima (y en el caso de cefuroxima, existe un halo muy pequeño), pero, de nuevo, también se induce la susceptibilidad.
- Cefalosporinas con grupo metoxi-imino modificado: es el caso de cefixime y ceftazidima (de 3ª generación). Para estas moléculas, no

hemos conseguido resultados concluyentes sobre su posible sinergia con el H₂S.

- Cefalosporinas de 4^a generación: cefepima y cefpirome son cefalosporinas de última generación que presentan igualmente un grupo metoxi-imino clásico. Sin embargo, frente a estas cefalosporinas en nuestros antibiogramas observamos ya un halo en ausencia de H₂S, por lo que es difícil evaluar su efecto, al igual que ocurre con cefotaxima o ceftriaxona en el caso de *E. faecium*. Pero sí es cierto que no hemos observado un aumento del halo frente a estos dos fármacos.

Según la bibliografía, el grupo metoxi-imino otorga al fármaco mayor permeabilidad a través de la membrana de las bacterias gram negativas y mayor estabilidad frente a las β-lactamasas (Nikaido *et al.* 1990). Lógicamente, ninguna de estas dos razones ayudan a dilucidar el mecanismo por el que el H₂S consigue que estas cefalosporinas sean eficaces frente a los enterococos. Lo más razonable es pensar que este radical metoxi-imino aumenta la afinidad o la accesibilidad del fármaco a la PBP5, pero solo de un modo suficiente en presencia de H₂S. Como veremos más adelante, la acción del H₂S sobre determinadas cisteínas puede alterar la estructura de las proteínas y/o de la pared celular, o bien puede disminuir o aumentar la reactividad de dichas cisteínas, modificando quizás el grado de accesibilidad del antibiótico a su diana.

1.2.2. Interacción del H₂S con otros antibióticos en *E. faecalis*

En nuestros antibiogramas hemos observado de igual manera que para otros β-lactámicos también se produce un aumento del halo, pero únicamente en casos en los que se partía ya de un halo considerable, como con ampicilina o imipenem (ver Tabla 7), lo cual indica, según CLSI y EUCAST, que la cepa es

sensible a estos antibióticos. Nos preguntamos entonces cómo de relevante es este hecho y, sobre todo, si debería tenerse en cuenta a la hora de intentar identificar el mecanismo responsable de la reversión de la resistencia a cefalosporinas. Claramente, el efecto producido por H₂S no es generalizado ni inespecífico, dado que se produce frente a antibióticos muy concretos y en especies muy concretas. Resultaría poco coherente que el H₂S no muestre sinergia con otras cefalosporinas, muchas de ellas con estructura muy similar a las metoxi-imino cefalosporinas, pero que sí lo haga con β -lactámicos más alejados, como es ampicilina o imipenem. Tiene más sentido pensar que las penicilinas y el imipenem, de por sí eficaces frente a *Enterococcus*, deterioran las bacterias a gran nivel y el H₂S acaba ejerciendo un mero efecto tóxico sobre células ya afectadas.

Respecto a la posible sinergia del H₂S con los aminoglucósidos, es un tema que requiere de más estudio y que podría resultar igualmente interesante desde un punto de vista clínico. Los enterococos sin mecanismos de resistencia adicionales presentan un bajo nivel intrínseco de resistencia a los aminoglucósidos. Dado que hemos observado que con H₂S se produce un incremento de los halos frente a todos los antibióticos de esta familia, parece razonable que la causa subyacente sea un mecanismo general que potencia la actividad de los aminoglucósidos. Precisamente, estos poseen actividad sinérgica con agentes que debilitan la pared bacteriana, facilitando el acceso de los aminoglucósidos a su diana terapéutica (el ribosoma). Esto refuerza la idea de que en *Enterococcus* el H₂S influye, en último término, sobre la pared celular de la bacteria o sobre un regulador de la misma.

Sin embargo, el principal inconveniente al pensar en una utilidad clínica H₂S-aminoglucósidos es que en aquellas cepas altamente resistentes a

aminoglucósidos, para las que precisamente resultaría de interés esta combinación terapéutica, el mecanismo de resistencia suele ser una enzima modificadora de aminoglucósidos, siendo improbable que el H₂S sea capaz de revertir la resistencia adquirida de esta manera. Pero, de cualquier modo, sería interesante comprobar cómo se comporta *Enterococcus* ante esta hipotética situación.

II. Fisiología del H₂S en *S. Typhimurium*

2.1. Caracterización del operón *phsABC* de *Salmonella Typhimurium*

2.1.1. Producción de H₂S por *S. Typhimurium*

Al deletar íntegramente el operón *phsABC* de *S. Typhimurium*, una de las principales vías de producción de H₂S en esta especie, hemos comprobado que es la única por la que la bacteria expulsa H₂S al exterior (y que, además, el sustrato tiosulfato no es utilizado por ninguna otra vía para producir H₂S). Al añadir al medio una fuente de cisteína, la cual es convertida por las vías 3MST y/o CysJIH a H₂S, hemos visto que se vuelve a liberar H₂S extracelularmente. Por tanto, la pregunta es si PHS es la única vía de producción de H₂S en condiciones basales, de la cual puede prescindir *S. Typhimurium* aparentemente sin perjuicios, o si otras vías se encuentran activas pero el H₂S producido por ellas solo actúa a nivel intracelular.

Para *Enterococcus*, hemos comprobado que en condiciones basales ya existe un notable nivel de sulfhidrilación interna, por lo que es bastante probable que ocurra lo mismo en *S. Typhimurium* y que, por tanto, exista alguna vía activa de producción interna de H₂S (o de transulfuración) en esta bacteria.

En el segundo caso, si existen vías alternativas de producción de H₂S, se desprenden varias conclusiones sobre el metabolismo intracelular del gasotransmisor. A pesar de ser una molécula capaz de difundir libremente a través de membranas, *S. Typhimurium* (al igual que otras bacterias) posee sistemas para contener el H₂S dentro de la célula. Probablemente el objetivo

sea regulador y preventivo, pues siendo el H₂S una molécula tóxica y reactiva, es conveniente contar con mecanismos de control del mismo. Además, como el pH intracelular, en condiciones fisiológicas, no va a ser ácido, la mayor parte del H₂S se va a encontrar en forma de ión HS⁻, el cual, por su reactividad, será más regulable y podrá ser expulsado a través de bombas en caso de ser necesario.

2.1.2. Función del operón PHS

Ya hemos visto anteriormente que el operón *phs* podría otorgar cierta ventaja a *Salmonella* en circunstancias muy específicas. Pero, ¿es esto suficiente motivo para que la bacteria produzca, de manera aparentemente constitutiva, H₂S en tales cantidades?

Algunos autores afirman que el H₂S contribuye a la resistencia a antibióticos de *Salmonella* al igual que en otras especies. No obstante, estos artículos presentan ciertas incongruencias. PHS es la principal vía de producción de H₂S en *S. Typhimurium*, pero los autores la han obviado en sus estudios y han delecionado otras, productoras de H₂S a partir de cisteína (o de cisteína a partir de H₂S). Esto no quiere decir que sus conclusiones, en las que afirman que sus mutantes presentan una alteración del perfil de antibiorresistencia, no sean válidas. Lo que resulta controvertido es que concluyan que se debe a la disminución (o al incremento) de los niveles de H₂S, pero no al incremento (o a la disminución, respectivamente) de los niveles de cisteína que se produce de forma primaria en estos mutantes, cuando está bien establecido que el exceso de cisteína contribuye al estrés oxidativo. De hecho, probablemente sea este exceso la razón por la que en nuestros experimentos observamos una gran producción de H₂S al añadir cisteína al medio. Por último, si en un mutante cuya vía CysJIH de producción

de H₂S se encuentra interrumpida se produce una pérdida de resistencia, ¿por qué la vía PHS no es capaz de compensar este efecto nocivo?

Al margen de estos artículos y volviendo a nuestros resultados, hay que mencionar que observamos un incremento de la resistencia a aminoglucósidos en *S. Typhimurium* al añadir tiosulfato, pero tanto en la bacteria silvestre como en el mutante de delección. Por ello, podemos descartar que la razón esté relacionada con la presencia o ausencia del operón. Más bien parece deberse a una interferencia o a un efecto protector del tiosulfato frente a los aminoglucósidos. De hecho, se ha sugerido la capacidad del tiosulfato para reducir el estrés oxidativo que provocan los aminoglucósidos y que podría ser responsable de su ototoxicidad; sin embargo, esta conexión entre estos antibióticos y el tiosulfato no ha conseguido ser demostrada (Hochman *et al.* 2006).

Es por estos resultados y argumentos por lo que hemos concluido que el H₂S no contribuye a la resistencia a antibióticos en esta especie.

Por tanto, el operón *phs* podría tener una función detoxificante, o bien compensatoria, dentro del metabolismo de *Salmonella*. Ya hemos comentado anteriormente que las células del epitelio intestinal metabolizan el H₂S a tiosulfato, el cual, a su vez, es oxidado a tetracionato. *Salmonella* puede utilizar sus rutas metabólicas para evitar que estos compuestos alcancen concentraciones tóxicas para la bacteria, al mismo tiempo que esto le otorga cierta ventaja competitiva respecto a otras bacterias del nicho intestinal.

También podría ocurrir que la función del operón *phs* sí sea de algún modo actuar como mecanismo compensatorio ante la falta de H₂S interna en el caso de que el resto de las vías no se encuentren activas.

2.1.3. Producción de H₂S por la vía PHS en *E. coli*

Hemos comprobado que el operón *phs* es funcional en la cepa MG1655 de *E. coli*, aunque parece que esta especie produce menos H₂S que *S. Typhimurium*. Esta diferencia podría deberse a la presencia en *Salmonella* de la sulfito reductasa, que, como vimos en la introducción, podría producir H₂S adicional a partir del sulfito generado secundariamente por la vía PHS.

III. Reversión de la resistencia a cefalosporinas de *Enterococcus* por *S. Typhimurium*

A lo largo del siglo XXI se han publicado algunos estudios sobre la existencia de una comunicación interbacteriana a través del aire. Sin embargo, todos estos artículos describen un papel beneficioso de una bacteria sobre otra.

En cambio, nosotros hemos observado cómo una bacteria también es capaz de perjudicar a otra por “control remoto”. En nuestro caso, esta acción ocurre por inhibición de mecanismos de resistencia a antibióticos.

Esto otorga a *Salmonella* Typhimurium una ventaja en la competición por el nicho intestinal. De nuevo, se sabe que el tratamiento de un paciente con cefalosporinas, con la consecuente disminución de la microbiota intestinal, es un factor predisponente para sufrir una disbiosis y un sobrecrecimiento de *Enterococcus*. Sin embargo, la presencia de *Salmonella* (u otras bacterias productoras de H₂S) en cantidades suficientes podría quizás anular esta posición privilegiada de los enterococos, especialmente en el caso de que estas bacterias posean resistencia intrínseca o adquirida a cefalosporinas, como ya se ha descrito en ocasiones (Tassios *et al.* 1999; Granier *et al.* 2011).

Además, este es un campo que podría involucrar a otras bacterias productoras de H₂S también presentes en el tracto digestivo, como es el género *Proteus*¹¹ o las bacterias reductoras de sulfato (SRB). Es por ello que sería de gran interés llevar a

¹¹ Algunas especies del género *Proteus* son intrínsecamente resistentes a algunas cefalosporinas, además de poder contar con mecanismos de resistencia adquiridos para las mismas ([CLSI] Clinical Laboratory Standards Institute 2017).

cabo estudios de competición entre *Enterococcus* y otros agentes productores de H₂S, tanto *in vitro* como *in vivo* o *ex vivo*.

IV. Estudio de la sulfhidrilación interna de *E. faecalis*

Hemos observado que *E. faecalis* presenta de forma basal un número considerable de residuos de cisteína que se encuentran formando persulfuros, lo que indica que la sulfhidrilación de proteínas es un mecanismo de regulación postranscripcional activo en esta bacteria.

Aunque el resultado no sea estadísticamente significativo, hemos observado que existe una tendencia a una mayor sulfhidrilación cuando *E. faecalis* crece en presencia de H₂S. Esto parece indicar que hay determinadas cisteínas que se encuentran expuestas y son susceptibles de reaccionar con el H₂S. Esta es una conclusión bastante predecible, especialmente para las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, como las que actúan como sensores redox. En el caso de *Enterococcus*, como vimos en la introducción, sería el caso de las peroxirredoxinas (AhpC y Tpx), Npr, los reguladores Rex y las enzimas Trx y Trx-reductasa y Spx. Sin embargo, es probable que otros tipos de proteínas se puedan ver igualmente afectados por este tipo de regulación, como ocurre en Eucariotas (Hourihan *et al.* 2013).

También hemos observado una tendencia en el perfil de sulfhidrilación de JH2-2 al crecer en presencia de cefotaxima (CTX), pero, sorprendentemente, en este caso el nivel de sulfhidrilación se reduce. Esto podría ser indicativo de que se produce un cambio en la expresión de algunas proteínas o en su conformación, lo que reduciría la facilidad con la que podrían ser sulfhidriladas endógenamente. No obstante, al

determinar la concentración de proteínas totales no parece haber, *grosso modo*, diferencias significativas en la cantidad de proteínas específicas entre una muestra y otra (refiriéndonos a las bandas observadas a cada tamaño de proteína).

Lógicamente, hacen falta estudios más potentes y en mayor profundidad para entender las consecuencias para la bacteria de este cambio en el patrón de sulfhidrilación. Sin embargo, sí podría estar relacionado con la pérdida de la resistencia frente a este antibiótico en particular en presencia de H₂S. La cefotaxima por sí sola, posiblemente gracias a su grupo metoxi-imino, podría desencadenar un aumento de la sulfhidrilación de determinadas proteínas, bien directamente o bien al aumentar el estrés oxidativo intracelular (como han defendido varios autores a lo largo de los años), dado que un aumento de ROS conllevaría una mayor oxidación de cisteínas a ácido sulfénico, el cual presenta mayor reactividad que el residuo tiol nativo. Este aumento insostenible de la sulfhidrilación activaría a la Trx-reductasa, enzima capaz, como ya se especificó, de reducir los tioles sulfhidrilados a su estado nativo. Si esta es la situación metabólica que tiene lugar, podría ocurrir que, al añadir H₂S, esta enzima no fuera capaz de compensar la acción sinérgica de la metoxi-imino cefalosporina con el H₂S y se produjera la muerte celular. En cambio, cefaclor (CEC), una cefalosporina sin grupo metoxi-imino, podría no inducir la acción de la Trx-reductasa si no origina un aumento tan significativo de la sulfhidrilación o si esta se produce sobre cisteínas innecesarias para la supervivencia bacteriana, y por ello observamos una mayor fluorescencia en presencia de cefaclor.

En varios experimentos preliminares que no se incluyen en esta Tesis, observamos que, al combinar cefaclor con H₂S, la fluorescencia se reduce. Siguiendo con la teoría anterior, esta reducción de la fluorescencia en la muestra de cefaclor con H₂S respecto a la que se ha incubado únicamente con el antibiótico podría deberse

precisamente a que ambos compuestos conjuntamente sí que estimulen la acción de la Trx-reductasa.

La situación contraria, aunque más compleja, también podría tener lugar. Podría ocurrir que el cefaclor desencadene una mayor sulfhidrilación de cisteínas, bien por su propia acción o como mecanismo de protección por parte de la bacteria (recordemos que la sulfhidrilación es una reacción reversible y regulada). En este contexto, al igual que anteriormente, una combinación del cefaclor con ácido sulfhídrico activaría a la tiorredoxina reductasa para resolver esta situación. La hipótesis sería que, por algún motivo, la cefotaxima no conlleva este aumento de la sulfhidrilación o del estrés oxidativo, con lo que, al añadir H₂S, la tiorredoxina reductasa no va a deshacer los persulfuros en proteínas claves para la resistencia a la propia cefotaxima. Esto, finalmente, llevaría a la muerte bacteriana.

Con todo, otras explicaciones son plausibles y, además, nuestros experimentos presentan una serie de limitaciones.

Para el análisis estadístico, inicialmente llevamos a cabo un Análisis de la varianza (ANOVA) con el que comprobamos que las muestras son diferentes entre sí (Tabla S7). A continuación, utilizamos el Test de Fisher LSD (*Least Significant Difference*), el cual es menos exigente al hacer un *pool* con las desviaciones estándar de todas las muestras, destacando así las tendencias existentes. Con este método, las diferencias entre WT respecto a CTX y respecto a H₂S no resultaron estadísticamente significativas, aunque sí observamos cierta tendencia, como ya hemos comentado más arriba. El test sí detectó diferencias significativas entre CTX (la muestra con menor sulfhidrilación) y H₂S, así como entre CTX y CEC. Especialmente interesante es esta última diferencia observada, la mayor de todas, pues indica que claramente la sulfhidrilación interna en presencia de ambos compuestos, a pesar de ser antibióticos cercanos entre sí, es totalmente opuesta.

Al margen de las consideraciones estadísticas, una de las posibles críticas de nuestros experimentos atañe a las concentraciones de antibiótico utilizadas. Tanto para cefotaxima como para cefaclor utilizamos una concentración de 8 mg/L. En el caso de cefotaxima, que presenta una CMI de más de 256 mg/L para JH2-2 y de 2-4 mg/L en presencia de H₂S, nuestro interés era utilizar una dosis cercana a la segunda y observar que seguía existiendo sinergia con H₂S. Para cefaclor, en cambio, nuestro objetivo era el contrario; siendo su CMI de 32 mg/L tanto en ausencia como en presencia de H₂S, quisimos comprobar que, aunque utilizemos una concentración cercana a la misma (8 mg/L), sigue sin haber sinergia entre ambos compuestos. Teniendo en cuenta que desconocemos los mecanismos que relacionan a los antibióticos con la sulfhidrilación celular, estas concentraciones elegidas podrían desvirtuar nuestros resultados.

Por ello, convendría hacer experimentos adicionales utilizando diferentes concentraciones de antibiótico (y también otros antibióticos) para comprobar cómo afectan al patrón de sulfhidrilación. Sería especialmente interesante utilizar concentraciones subinhibitorias de cefotaxima en combinación con H₂S hasta obtener una concentración a la que la bacteria sí pueda crecer y podamos observar la sulfhidrilación a dicha concentración¹².

¹² Recordemos que nuestros resultados de fluorescencia no incluyen la muestra con CTX+H₂S, dado que esta no crece.

V. Análisis *in silico* de posibles genes y proteínas implicados en la reversión de la resistencia a cefalosporinas por el H₂S

Dado que la inducción de la susceptibilidad a cefalosporinas a través del H₂S parece ser un fenómeno limitado a *Enterococcus*, entendimos que debía estar mediado por un mecanismo muy específico de este género y no a través de una acción sinérgica general, como podría ser el caso de los β -lactámicos con aminoglucósidos.

Inicialmente, descartamos que la causa sea un desequilibrio del estado oxidativo general de la célula, dado que, en primer lugar, nuestros resultados han sido reproducibles también en anaerobiosis. Además, ya hemos hablado de la batería de herramientas que poseen los enterococos para defenderse de las especies reactivas de oxígeno. Por último, Shatalin *et al.* afirman que el H₂S ejerce precisamente el papel contrario, protegiendo a las bacterias del estrés oxidativo. Por tanto, asumimos que el H₂S debía actuar en *Enterococcus* por la vía que la mayoría de los autores defienden, es decir, vía modificación postranscripcional de las cisteínas.

Partiendo de esta hipótesis, realizamos un análisis *in silico* de aquellas proteínas que se han vinculado con la resistencia a cefalosporinas o con otros fenotipos cercanos en esta bacteria y que, por tanto, podrían ser responsables de la sinergia entre el H₂S y las cefalosporinas (Anexo II). Aun así, conviene recordar que la resistencia a cefalosporinas en *E. faecalis* y *E. faecium* es un tema en continuo estudio y para el que aún hace falta investigar en mayor profundidad, pues la mayoría de los autores

coinciden en sus conclusiones en que aún faltan piezas en el puzle para poder comprender plenamente cómo se produce la resistencia.

5.1. Proteínas vinculadas con la resistencia a cefalosporinas

Aparte de la PBP de baja afinidad, que parece ser el componente central de la resistencia a cefalosporinas, existen otros factores implicados bien descritos, como hemos visto en la introducción. No obstante, varios de ellos no presentan ninguna cisteína en su estructura, por lo que fueron inicialmente descartados. Es el caso de PBP5, su proteína asociada P5AP, las PBPs de clase A, el sistema CroR/CroS, IreK o IreB. El sistema CisR/CisS no lo hemos considerado dado que no está presente en nuestras cepas utilizadas. La proteína BppA2 la hemos descartado de antemano dado que una delección de la misma sólo reduce la CMI de JH2-2 a 128 mg/L (Bouhss *et al.* 2002), por lo que no se correlaciona con nuestros resultados.

Esto reduce el número de posibles factores sobre los que podría estar actuando el H₂S, habida cuenta de que la reversión de la resistencia tenga lugar por alteración de uno de los componentes ya conocidos, como discutiremos a continuación (Tabla S4).

- IreP (StpA en *E. faecium*) posee una cisteína dentro de su secuencia codificante. La falta de esta proteína produce hiperresistencia (Hall *et al.* 2013) y un considerable coste biológico para la bacteria, así que podemos descartar que el H₂S la anule y, en todo caso, la unión del H₂S debería incrementar su actividad hasta producir susceptibilidad, lo cual parece improbable al ser un sistema de dos componentes regulables entre sí.
- RpoB presenta tres cisteínas en su estructura. Diferentes mutaciones aminoacídicas se han relacionado con una alteración de la resistencia a cefalosporinas. Sin embargo, ninguna de las mutaciones descritas afecta a las

cisteínas y, además, es probable que mutaciones en *rpoB* tuvieran otras consecuencias para la bacteria (como es la resistencia a rifampicina), las cuales no hemos observado en nuestros experimentos.

- MurAA participa en el primer paso de la síntesis del peptidoglicano. Su delección conlleva una pérdida de la resistencia a cefalosporinas y su sobreexpresión una recuperación de la resistencia en un mutante $\Delta ireK$. MurAA no solo presenta una única cisteína, sino que está descrito que una sustitución de dicha cisteína por una serina conlleva una pérdida de la actividad catalítica de MurAA e impide que su sobreexpresión compense la falta de IreK. Por tanto, esta enzima es uno de los firmes candidatos a reaccionar con el H_2S .
- Las enzimas relacionadas con el metabolismo de la timina, como son la timidilato sintasa o la dihidrofolato reductasa, presentan 2-3 cisteínas cada una. Lo mismo ocurre para RmlA (glucosa-1-fosfato timidililtransferasa), la cual necesita de la timidina trifosfato proveniente del metabolismo de la timina. Alteraciones en estas proteínas y sus vías afectan a la resistencia a cefalosporinas específicamente de *E. faecalis* y *E. faecium*, por lo que también sería interesante ver si sus cisteínas pueden verse afectadas por el H_2S .

5.2. Proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y otras candidatas

Previamente descartamos que el H_2S inhiba la resistencia a cefalosporinas de *Enterococcus* a través de un incremento del estrés oxidativo. Sin embargo, algunas de las enzimas reguladoras del estrés oxidativo en *E. faecalis* han sido relacionadas directamente con la resistencia a este grupo de antibióticos.

Además, hemos visto cómo la reacción del H₂S con cisteínas requiere de un modo casi imprescindible la oxidación previa del grupo tiol (-SH) a ácido sulfénico (-SOH). En tal caso, es posible que sea necesaria una correcta coordinación de las diferentes enzimas detoxificadoras. En caso contrario, se podría producir una situación de estrés oxidativo, incluso por radicales de origen endógeno, que afectara a las cisteínas y aumentara su reactividad, o bien que debilitara a la bacteria haciéndola susceptible a la acción de las cefalosporinas. Por otro lado, muchas de las enzimas antioxidantes, por su propia naturaleza, van a reaccionar con toda seguridad con el H₂S, y puede ser que desencadenen otros mecanismos aún no definidos.

Dentro de las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo (Tabla S5), ni la superóxido dismutasa (ya demostrada clave en *E. faecalis* para la tolerancia a algunos antibióticos) ni la catalasa cuentan con cisteínas en su secuencia aminoacídica.

- El represor Rex (codificado por EF2638) sí cuenta con una cisteína y, además, se ha visto que su delección provoca una hiperresistencia a cefalosporinas. Sin embargo, su acción está condicionada a situaciones de aerobiosis, por lo que podemos descartar que sea responsable de nuestros resultados dado que también observamos una sinergia H₂S-cefalosporinas en anaerobiosis.
- La enzima NADH peroxidasa también cuenta con una cisteína que, de hecho, alterna entre el estado tiol nativo (-SH) y ácido sulfénico (-SOH) durante el desdoblamiento del peróxido de hidrógeno a H₂S y O₂ (La Carbona *et al.* 2007). Además, se ha observado que un mutante con su gen codificante *npr* interrumpido es susceptible a cefalosporinas, aunque esto parece contradecir lo expuesto sobre el papel de Rex. Por otra parte, mediante experimentos de complementación de *npr* realizados en nuestro laboratorio

anteriormente no se consiguió recuperar la resistencia a cefalosporinas, por lo que podría ser necesaria una revisión de la implicación de la NADH peroxidasa en la resistencia a estos antibióticos.

- El resto de las enzimas, como son las tiol peroxidases, es muy probable que reaccionen con el H₂S por su propia naturaleza, así que sería de cierto interés estudiar cómo se producen estas interacciones, aunque, desde el punto de vista de la resistencia a cefalosporinas, no son los genes más relevantes *a priori*.
- Algo similar ocurre con el regulador global Spx, que presenta un motivo CXXC. Su reactividad con el H₂S parece probable, pero, dado que está bien estudiado, parece improbable que su alteración afecte a la resistencia a cefalosporinas.
- La L,D-transpeptidasa ha sido relacionada directamente con la resistencia a β-lactámicos en *E. faecium*, al ser capaz de compensar la falta de PBP5. En principio, no debería estar relacionada con la acción del H₂S, puesto que, aunque este la inhiba, la bacteria seguiría siendo resistente por la acción de la propia PBP5. Pese a ello, resulta difícil descartarla teniendo que en cuenta que está directamente relacionada con la estructura de la pared y con la resistencia a β-lactámicos, que es una enzima alternativa a las PBPs clásicas y, lo que resulta más sugerente, su centro activo es una cisteína.

5.3. El operón pyr

Este grupo de genes, encargados de la síntesis *de novo* de las pirimidinas, está bien descrito en diferentes especies bacterianas (Turnbough & Switzer 2008) y posee un sistema de autorregulación por atenuación de la transcripción.

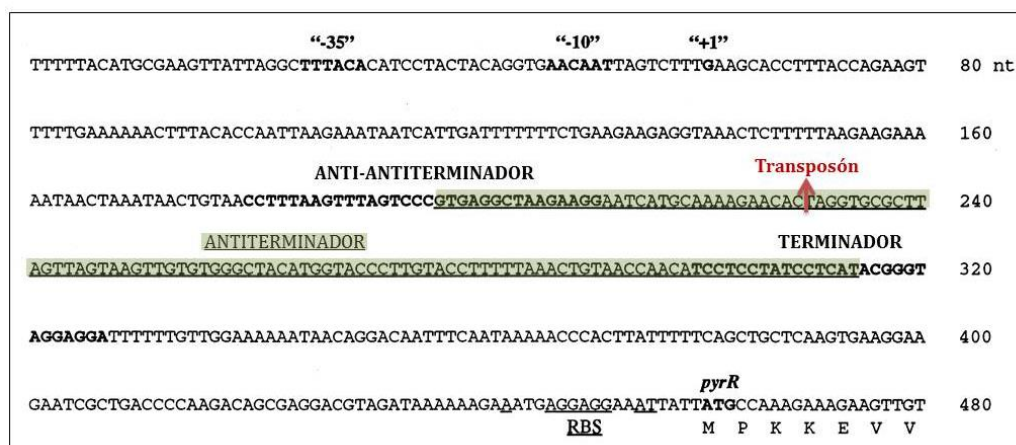


Figura 31. Secuencia de la región 5'-UTR del operón *pyr* en *E. faecalis*. En verde aparece destacada la secuencia del antiterminador. En rojo se indica el lugar de inserción del transposón. RBS: Sitio de unión del ribosoma. Modificado de Ghim *et al.*, 1999.

Al comenzar la transcripción del operón, la primera zona transcrita va a ser la secuencia 5'-UTR (*untranslated región*), que es la región reguladora situada delante del operón (Figura 31). En caso de que los niveles de uracilo y uridina sean bajos, el antiterminador formará una horquilla que permitirá que el resto de los genes del operón se expresen (Figura 32).

Sin embargo, cuando los niveles de uracilo y uridina son altos, el primer gen expresado del operón produce el represor PyrR, que se une al ARNm del anti-antiterminador y desestabiliza al antiterminador (Figura 33). En consecuencia, se van a formar las horquillas tanto del anti-anti terminador como del terminador, que inhibirá la transcripción del resto del operón (Ghim *et al.* 1999).

Para ser exactos, en nuestro mutante Pyr- el transposón se encuentra interrumpiendo el antiterminador del operón *pyr* (Figura 31). Por tanto, lo más probable es que la horquilla del antiterminador no se pueda formar y se esté formando la horquilla del terminador. En consecuencia, la producción de pirimidinas debería estar atenuada en este mutante resistente a CTX-H₂S.

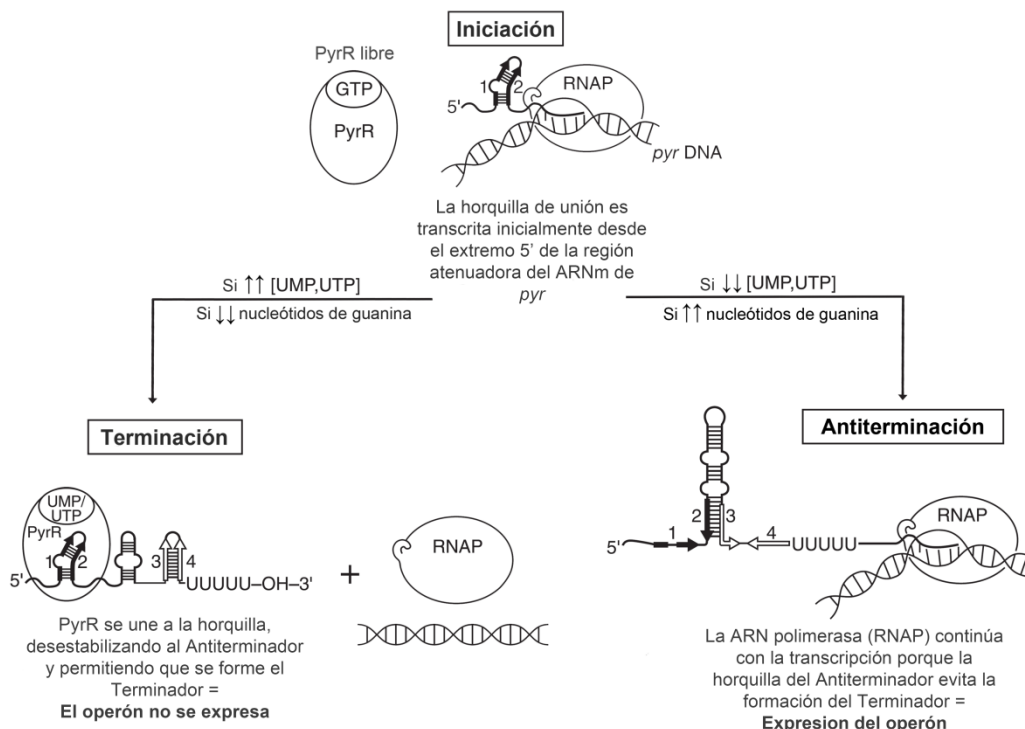


Figura 32. Mecanismo de autorregulación del operón *pyr* en función de las concentraciones de uracilo y uridina. Modificado de Turnbough & Switzer 2008.

Como ya hemos visto, la timina y de su derivado timidilato, precursor del polisacárido Epa, han sido relacionados con la resistencia a cefalosporinas en *Enterococcus* (Hoff & Kristich 2016). En la misma línea, nosotros hemos obtenido un mutante relacionado con las pirimidinas y capaz de mantener su resistencia en presencia de H₂S. Esto podría ser un indicio de que el H₂S actúa a través de esta vía. Sin embargo, lo lógico sería que el mutante incrementara la síntesis de pirimidinas, no que la inhibiera. Podría ocurrir que la inserción del transposón desestructure toda la región reguladora y no

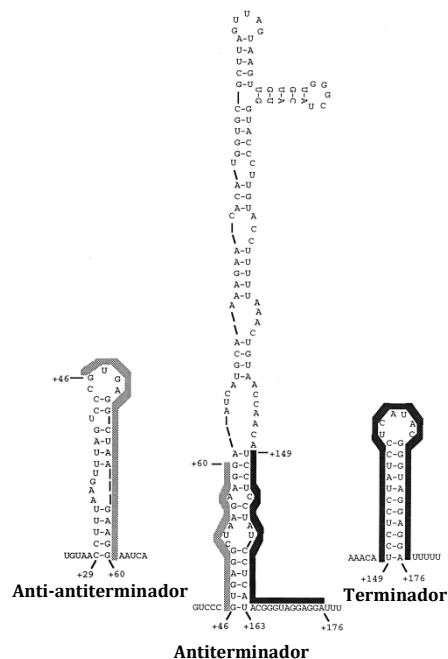


Figura 33. Posibles estructuras secundarias de la región 5'-UTR del operón *pyr*. Modificado de Ghim *et al.* 1999.

se pueda formar ninguna de las horquillas. Sería conveniente intentar complementar al mutante con una fuente exógena de pirimidinas para comprobar si ello inhibe la acción del H₂S en la bacteria silvestre.

5.4. El mutante espontáneo EF2466

Antes de considerar el gen EF2466 como clave en la resistencia a cefalosporinas en presencia de H₂S, tendríamos que interrumpir el gen o introducir el cambio aminoacídico por mutagénesis dirigida. Para nuestro mutante, este paso es especialmente relevante dado que el gen EF2466 cuenta con varias regiones repetidas y, de hecho, al analizar en profundidad la secuencia de la cepa V583 WT, encontramos que, aparte de la región en la que se produce el cambio nucleotídico no sinónimo (Figura 29), existe otra región similar en la que la cepa silvestre ya cuenta con lisina en su secuencia. Estas características del gen dificultan su correcto ensamblado y análisis.

En el caso de que la mutación y el fenotipo se confirmasen en un nuevo mutante, la proteína codificada por EF2466 sí contiene tres cisteínas, aunque las tres se encuentran en los extremos y, aparentemente, fuera de los dominios conservados. En la base NCBI solo aparece anotada como proteína hipotética, pero la base GenomeNet (parte del KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) le atribuye dos motivos con posible función reguladora de la actividad carboxipeptidasa. No solo eso, sino que, de acuerdo a estas bases de datos, el gen EF2464, prácticamente adyacente, podría codificar para una glicosiltransferasa (que, como recordamos, es una de las funciones que llevan a cabo las PBPs de clase A). Por tanto, es posible que esta región del genoma codifique para enzimas similares a las encargadas de la síntesis de la pared. En ese caso, la cuestión sería por qué una mutación del gen EF2466 permite a la bacteria resistir a las cefalosporinas en presencia de H₂S.

Finalmente, no debemos olvidar que aquellos mutantes que hemos obtenido (Pyr- y EF2466-) podrían no estar directamente vinculados a la acción del H₂S, sino que sean un mecanismo secundario *downstream* para sobrevivir cuando otras vías de la bacteria son bloqueadas. De igual forma, la causa responsable de la reversión de la resistencia podría no estar directamente conectada con ninguna de las proteínas y genes aquí descritos. El H₂S podría actuar por otra vía o bien afectar a las cisteínas de proteínas aparentemente no relacionadas o de otras que desestabilicen de forma secundaria a alguna proteína clave para la resistencia a cefalosporinas.

No obstante, de todos los posibles mecanismos descritos que podrían estar implicados, tres de ellos parecen candidatos más seguros. En primer lugar, la L,D-transpeptidasa, que, como ya se ha comentado, no se ha relacionado directamente con la resistencia a cefalosporinas, pero su analogía con las PBPs clásicas y la presencia de una cisteína en su centro activo sugieren una conexión entre los β-lactámicos y el H₂S. Además, es una enzima descrita apenas hace una década, por lo que el conocimiento sobre la misma no es muy extenso.

En segundo lugar, la ruta de las pirimidinas, en general, y de la timina, en particular, podría ser la responsable, por la ya conocida vinculación con la resistencia a cefalosporinas como por la obtención de un mutante resistente que precisamente presentaba una interrupción en el operón de síntesis de las pirimidinas. Dado que es una vía muy extensa, haría falta analizarla en profundidad para identificar las posibles proteínas específicas que estarían implicadas.

Por último, y por la sencillez de su hipótesis, el más firme candidato, es la proteína MurAA, encargada de la síntesis del primer precursor del peptidoglicano. Está descrito que la mutación de su única cisteína afecta directamente a la resistencia a cefalosporinas de *Enterococcus faecalis*, por lo que sería muy interesante comprobar si dicha cisteína puede reaccionar con el H₂S.

VI. Experimentos futuros

Para avanzar en la disección de la reversión de la resistencia a cefalosporinas por el H₂S, habría que profundizar, como acabamos de comentar, en el estudio de los diferentes genes candidatos, bien por técnicas de mutagénesis (en el caso de algunos genes *redox*, la vía de la timina y, posiblemente, la L,D-transpeptidasa), de complementación (para nuestros mutantes *pyr-* y EF2466), de sobreexpresión en trans (para el caso de MurAA) u otras.

En caso de que el H₂S actúe por un mecanismo de sulhidrilación, uno de los estudios básicos debería ser la identificación de los residuos de cisteína del proteoma de *Enterococcus* que interaccionan con el H₂S, es decir, la caracterización de su sulhidroma. Esto no solo sería de interés para el estudio de la sinergia H₂S-cefalosporinas, sino que, teniendo en cuenta la implicación del H₂S en diferentes procesos metabólicos, es muy posible que el sulhidroma nos permita identificar y caracterizar nuevas rutas en *Enterococcus* y otros organismos. También sería conveniente optimizar los experimentos de fluorescencia llevados a cabo.

Por otro lado, la influencia a distancia entre bacterias, a través del H₂S y otros gases producidos por diferentes especies, es un campo de estudio apenas explorado pero que puede revelar el todavía más elevado nivel de complejidad que existe en las relaciones interbacterianas. De hecho, hablando específicamente del H₂S, podría ocurrir que este gas tenga un efecto dual, siendo capaz al mismo tiempo de promover la resistencia a antibióticos en unas bacterias y de inhibirla en otras. Esto debería ser tenido en cuenta a la hora de pensar en futuras aplicaciones clínicas de este gas, tanto en el campo de la microbiología como en otros.

Para profundizar en esta perspectiva clínica, sería conveniente avanzar en conceptos relacionados con la farmacodinamia y farmacocinética de la interacción H₂S-cefalosporinas. ¿Es necesario que ambos compuestos actúen a la vez, o uno de ellos requiere la presencia previa del otro? De nuestros experimentos podemos deducir que no es imprescindible un “shock” inicial con H₂S (como podría estar ocurriendo en los experimentos incubados con NaSH¹³), pues en los enfrentamientos con *Salmonella* Typhimurium ya hemos dejado patente que hacen falta varias horas antes de que haya una cantidad de H₂S mínima.

También desde un punto de vista clínico, sería interesante testar si la reversión de la resistencia a cefalosporinas se produce igualmente en combinación con alguno de los donadores lentos de H₂S que existen en el mercado. Es el caso de la molécula GYY4137, cuya eficacia como agente vasodilatador ya se ha demostrado en modelos *in vivo* (Li *et al.* 2008). *A priori*, al menos en los experimentos *in vitro* con *Enterococcus*, deberíamos observar un efecto sinérgico de esta molécula con cefotaxima u otra metoxi-imino cefalosporina, dado que, de nuevo, la liberación de H₂S por *S. Typhimurium* también se produce de manera lenta y progresiva.

Después se podría proceder a testar la combinación farmacológica en un modelo *in vivo*. Incluso se podrían llevar a cabo infecciones experimentales en un organismo simple como *Caenorhabditis elegans* y sobreexpresar la producción de H₂S añadiendo cefotaxima al medio.

¹³ Recordemos que se ha afirmado que los donadores de H₂S como NaSH producen una liberación inicial muy rápida de H₂S para, a continuación, reducirse la concentración del mismo drásticamente por la corta vida media del H₂S en solución.

VII. Implicaciones y trascendencia del trabajo

La resistencia a antibióticos supone hoy en día una de las principales amenazas mundiales para la salud humana y las predicciones son que, en pocas décadas, será responsable de más de 10 millones de muertes anuales y que puede ser responsable de una crisis económica global similar a la vivida recientemente.

Es por ello que los diferentes organismos nacionales, europeos e internacionales están promoviendo la implantación de programas encaminados a combatir y frenar la resistencia a los antimicrobianos y a concienciar sobre sus consecuencias.

Una de las principales razones por las que nos encontramos actualmente en esta situación tan crítica es el agotamiento de las fuentes de nuevos antibióticos. Durante décadas, malgastamos y abusamos de estos fármacos tan preciados e ignoramos la emergencia de cepas resistentes por el continuo descubrimiento de nuevas moléculas que podían compensar dichas resistencias. Pero, desde hace 30 años, apenas se han descubierto una decena de nuevos agentes y actualmente es necesario encontrar nuevas formas de combatir la antibiorresistencia.

Nuestro trabajo sigue esa tendencia. No hemos estudiado el mecanismo de acción de un nuevo fármaco en *Enterococcus*, uno de los 12 patógenos multirresistentes más críticos según la OMS, sino que hemos descubierto una forma de anular la resistencia intrínseca de esta bacteria a toda una familia de antibióticos. Únicamente el mero hecho de poner de manifiesto que esto es factible, que, si encontrar nuevos antibióticos resulta casi imposible, quizás podamos utilizar los fármacos

tradicionales contra patógenos clásicamente resistentes, puede abrir la puerta a una nueva forma de luchar contra la resistencia a antibióticos.

Además, aunque este trabajo tiene un claro enfoque molecular y no clínico, nuestros resultados podrían ser extrapolables con relativa sencillez, dado que ya existen en el mercado compuestos liberadores de H₂S destinados a un futuro uso terapéutico.

Por otra parte, con nuestro trabajo pretendemos contribuir significativamente al estudio de los efectos del H₂S, tanto a nivel de resultados como de herramientas utilizadas durante la Tesis. Las referencias metodológicas en este ámbito son escasas y es por ello que a lo largo de nuestras investigaciones hemos tenido que desarrollar (basándonos en el ingenio en ocasiones) una serie de técnicas pioneras con las que poder avanzar en nuestros experimentos y que esperamos sean útiles para otros investigadores.

Finalmente, esta Tesis doctoral también profundiza en un campo apenas estudiado, el de la interacción de las bacterias entre sí a través del aire. El concepto de *quorum-sensing* ya supuso una revolución en su día en el estudio de la comunicación bacteriana. En la última década, se ha visto que una bacteria también puede beneficiar a otra aunque no se encuentren en el mismo medio. Nosotros hemos demostrado por primera vez que esta interacción a distancia entre bacterias también puede tener consecuencias negativas sobre una de ellas, ocurriendo esto de una forma muy específica. Puede que esto tenga lugar por razones de competición (por ejemplo, en la ocupación del nicho) o puede que no haya una razón aparente. En cualquiera de los casos, ¿por qué hay bacterias que producen ácido sulfhídrico en grandes cantidades, pero no monóxido de carbono ni óxido nítrico?

Incluso cuando hallemos la respuesta, este concepto de *air-sensing* deja patente que la complejidad del mundo bacteriano sigue planteándonos incógnitas y sorprendiéndonos de las maneras más insospechadas. De momento, mientras los científicos llevamos décadas luchando contra las bacterias multirresistentes, *Salmonella Typhimurium* es capaz de conseguir lo que no hemos logrado nosotros en un siglo: pillar “desprevenido” a *Enterococcus* y revertir su resistencia intrínseca a cefalosporinas.

CONCLUSIONES

We can only see a short distance ahead, but we can see plenty there that needs to be done.

Alan M. Turing

Computing machinery and intelligence. *Mind*, 59, 433-460 [1950]

Las conclusiones de este trabajo son:

PRIMERA. El gasotransmisor ácido sulfhídrico (H_2S) revierte la resistencia intrínseca a las metoxi-imino cefalosporinas, antibióticos de gran importancia clínica, en los patógenos nosocomiales *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*.

SEGUNDA. La bacteria *Salmonella* Typhimurium es igualmente capaz de revertir a distancia la resistencia a cefalosporinas de *E. faecalis*, específicamente a través del H_2S producido por su operón *phsABC*.

TERCERA. La delección del operón *phsABC* de *S. Typhimurium* anula por completo la expulsión de H_2S al medio. Esto quiere decir que, en caso de que otras vías (3MST, CysJIH) se encuentren activas, la producción de H_2S por parte de estas ocurre únicamente a nivel intracelular.

CUARTA. El H₂S no influye en el perfil de antibiorresistencia ni en el nivel de crecimiento de *S. Typhimurium*. El grado de tolerancia de las bacterias al H₂S es muy diferente entre ellas, pero ni el H₂S de origen químico ni el producido por *S. Typhimurium* afectan a la resistencia a antibióticos de ninguna otra bacteria testada.

QUINTA. Al marcar por fluorescencia los residuos de cisteína que reaccionan con el H₂S, hemos observado que, en estado basal, ya existe cierta sulfhidrilación interna en *E. faecalis*. Además, el nivel de sulfhidrilación de las bacterias incubadas con cefotaxima (una metoxi-imino cefalosporina) es significativamente menor que el observado al incubarlas con H₂S o con cefaclor (una cefalosporina sin grupo metoxi-imino).

SEXTA. Si el H₂S revierte la resistencia a cefalosporinas de *E. faecalis* y *E. faecium* a través de la modificación de sus residuos de cisteína, las proteínas MurAA, Ldt y las relacionadas con la ruta de las pirimidinas parecen las candidatas de mayor peso, aunque no se puede descartar que el efector sea otra proteína no detectada.

ANEXOS

And therewithal, whenever I found out anything remarkable, I have thought it my duty to put down my discovery on paper, so that all ingenious people might be informed thereof.

Antonie van Leeuweok

Letter June 12, 1716

I. Perfil de antibiorresistencia en presencia de H₂S

Tabla S1. Antibiogramas de diferentes especies en presencia de H₂S.

	<i>E. cloacae</i>		<i>C. freundii</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	WT	+H ₂ S 0,19	WT	+H ₂ S 0,19	WT	+H ₂ S 0,19
Amox. - Ac. clavulánico 30	8	10	8	9	12	15
Cefaclor 30	6	10	6	6	6	6
Cefotetán 30	8	12	6	8	6	6
Cefuroxime 30	6	6	6	6	6	6
Ceftriaxona 30	18	24	9	12	6	6
Cefotaxima 30	19	20	9	13	17	15
Cefpodoxima 10	6	6	6	6	9	13
Ceftizoxima 30	18	20	11	15	28	29
Cefoxitina 30	6	6	6	8	6	6
Cefamandol 30	6	10	6	6	6	6
Ertapenem 10	21	19	6	12	17	17
Imipenem 10	27	30	17	24	6	6
Aztreonam 30	24	30	22	21	6	6
Gentamicina 10	6	6	6	6	6	6
Estreptomicina 10	6	6	13	15	21	24
Ciprofloxacina 10	6	9	6	6	6	6
Ácido nalidíxico 30	6	6	6	6	13	15
Sulfa - Trimetoprim 25	6	6	6	6	20	24
Tetraciclina 30	6	6	6	6	6	6
Clindamicina 2	6	6	6	6	6	6
Colistina 10	14	18	16	18	6	10
Cloranfenicol 50	6	6	14	20	6	6
Eritromicina 15	6	6	6	6	16	19
Mupirocina 5	6	10	6	8	6	6
Rifampicina 5	6	6	6	8	6	10
Vancomicina 30	6	6	6	6	6	6
Fosfomicina 200	23	24	19	20	16	19

Tabla S2. Antibiogramas de *S. Typhimurium*.

	<i>S. Typhimurium</i> WT		<i>S. Typhimurium</i> <i>Δphs</i>	
	TSB	TSB + T-S 20	TSB	TSB + T-S 20
Amox. - Ac. clavulánico 30	31	28	32	29
Cefaclor 30	31	30	29	31
Cefotaxima 30	34	34	34	34
Cefpodoxima 10	28	29	30	27
Cefoxitina 30	26	25	29	25
Imipenem 10	33	32	33	32
Aztreonam 30	38	34	34	34
Apramicina 15	13	10	13	9
Gentamicina 10	16	14	17	14
Neomicina 30	16	14	15	13
Netilmicina 30	19	17	19	17
Estreptomina 10	12	7	12	7
Ciprofloxacina 10	35	37	35	36
Sulfa - Trimetoprim 25	29	30	29	30
Tetraciclina 30	27	27	26	27
Clindamicina 2	6	6	6	6
Colistina 10	14	14	13	14
Cloranfenicol 50	25	27	28	28
Eritromicina 15	7	6	6	7
Mupirocina 5	6	6	6	6
Rifampicina 5	9	7	9	9
Vancomicina 30	6	6	6	6
Fosfomicina 200	36	30	33	31

Tabla S3. Antibiogramas de *E. coli*.

	<i>E. coli</i> MG1655 WT		<i>E. coli</i> MG1655 Δ MST		<i>E. coli</i> MG1655 Δ MST + pSB74	
	TSB	+H ₂ S 0,19	TSB	TSB + T-S 20	TSB	TSB + T-S 20
Ampicilina 10	19	18	30	30	6	6
Amox. - Ac. clavulánico 30	20	19	27	29	19	21
Cefaclor 30	24	24	28	30	18	21
Cefotaxima 30	35	33	>40	>40	>40	>40
Cefoxitina 30	23	22	27	25	29	27
Ertapenem 10	33	32	34	35	35	38
Imipenem 10	30	26	36	34	35	34
Aztreonam 30	36	31	>40	>40	39	40
Gentamicina 10	20	18	20	20	22	22
Estreptomina 10	16	14	17	14	17	13
Ciprofloxacina 10	35	31	38	>40	>40	40
Ácido nalidíxico 30	23	26	25	26	26	26
Sulfa - Trimetoprim 25	29	25	30	32	35	35
Tetraciclina 30	25	23	27	28	28	28
Clindamicina 2	6	6	6	6	6	6
Colistina 10	14	15	15	20	18	22
Cloranfenicol 50	25	23	26	30	30	33
Eritromicina 15	9	8	10	10	13	14
Mupirocina 5	6	9	6	6	6	6
Rifampicina 5	9	8	10	11	14	14
Vancomicina 30	6	6	6	6	6	8
Fosfomicina 200	26	22	28	31	35	35

II. Proteínas candidatas con cisteínas

Tabla S4. Proteínas relacionadas con la resistencia a cefalosporinas en *Enterococcus* y que contienen al menos una cisteína (en amarillo) en su secuencia aminoacídica. Se indica si las proteínas favorecen la resistencia (en verde), la reducen (en rojo) o si ambos efectos están descritos (amarillo).

IreP/StpA (EF3121)	Ser/Thr fosfatasa de IreK y posiblemente de otros factores. Controla a la L,D-transpeptidasa. (Desbonnet <i>et al.</i> 2016)
MEINVQSDVGRKRNTNQDYANVFENQQHITFAVLADGMGGHQAGDVASQMAVNNLGESWSNASVDSA EKSA QWLIQAIQKENEKIYERGGQSKPEYLGMGTTVVGAILLPDSFVLAVNGDSRAYLVRDQHMLQLTEDHSLVNLVK SGEITREMAANHPRKNVLRSLGMPGTVEVDVTNHEWLPNDYLLCSDGLTNMVPETKILEILETSDPLESKLSQ LVAQANEAGGLDNITVLVIHFDEQKEENQ	
RpoB (EF2328)	Subunidad β de la ARN polimerasa. Mutaciones en su secuencia afectan a la resistencia a cefalosporinas. (Kristich & Little 2012)
MKSLAGHVVKYGKHRERRSFARISEVLELPLNIEIQTDSYQWFLDEGLREMFEDILPIDDFQGNLSLEFVDYELKE PKYTVEEARAH DANYSAPLHVTLRLTNRETGEIKSQEVFFGDFPLMTEMGTFIINGAERVIVSQLVRSQVYFHHG KVDKNGKEGFGSTVIPNRGAWLEMETDAKDYSYVRIDRTRKIPLTVLVRALGFGSDDTIFEIFGDSESLRNTIEKDL HKNASDSRTEEGKDIYERLRPGEPKTADSSRSLLTARFFDPKRYDLANVGRYKVNKKLDLKRLLNLTAE TLV DPETGEIIVEKGTVLTHQIMETLGEYIDNGLNSVTYYPSED AVVTEPMTIQVIQVLSPKDPERIVNVIGNGYPDDSV KTVRPADIVASMSYFFNLMEDIGNVDDIDHLGNRRISV GELLQNFRIQLARMERVVRRERMSIQDTETLTPQQ LI NIRPVVASIKEFFGSSQLSQFMDQTNPLGELTHKRRLSALGPGLTRDRAGYEVRDVHYSHYGRMCPIETPEGP NIGLINSLSYAKVNFKGFIEPTPYRRVDRATGRVTDQVDYLTADIEDHYIVAQANSLLNEDGTFANDVVMARLQS ENLEVAVDKVDYMDVSPKQVAVATA CIPFLENDSDNRALMGANMQRQAVPLIQPRSPWVGTGMEYKSAHDS GAALLC KHDGVVEFVDAKEIRVRRDNGALDKYMTKFRRSNSGTSYNQRPIVHLGEKVEKGDTLADGSPMEEG EMALGQNVLVAFMTWEGYNYEDAIIISRRLVKDDVYTSVHIEEYSEARDTKLGPEEITREIPNVGEDALKDLDE MGIIRIGAEVQDGDLLVGKVT PKGVTELSAEERLLHAIFGEKAREVRDTSLRVPHGGGGIVHDVKIFTREAGDELS PGVNMLVRVYIVQKRKIHEGDKMAGRHNKGVVSRIMPEEDMPFLPDGTPVDIMLNPLGVPSRMNIGQVLELHL GMAARQLGIHVATPVFDGATDEDVWETVREAGMASDAKTVLYDGRTGEPFDNRISVGVMYMIKLAHMVDDKHL ARSIGPYSLVTTQQLPGGKAQFGGQRFGEVWALEAYGAAYTLQEILTYKSDDVVGRVKT YEAIKGEPIPKPG VPESFRVLVKELQSLGLDMRVL DIIIEAEIELRDMDDDDDLITVDALTKFAEQSAKQLEKEAESVVKEEAQD VV QEIETAEDRD	
MurAA (EF2605)	Cataliza el primer paso en la síntesis del precursor del peptidoglicano. (Vesic & Kristich 2012)
MEQIIVHGGNTKLEGTVKIEGAKNAVLPIAATLLAAEEGVTTLKNVPILSDVFTMNQVIKHLNVAIDFDEDANEVTID ATQPLGIEANYEYVSKMRASIVVMGPLLARNGHAKVAMPGG C AIGKRPIDLHLKGFQALGAKI QKNGYIEAIADE LIGNTIYLD FFSV GATQ NIMMAAVRAKGT TIIENVAREPEIVDLANILNKMGANVIGAGTETMRIEGVDKLHAVEHSI VQDRIEAGTFMVAAMTEGNV LIEE AISEHNRPLISKLEMGAIIEEENGIRVIGPKHLKPTDVKTMPHPGFPTD MQAQMTAIQMFAEGTSIVTETVFENRYQHLEEMRRMNADLKIDGNAVINGGNE LQGAAVEATDLRAAAALILVG L RANGITRVS NLKYLD RGYEFHKKLQKLGANVERVND EKIEEKQATT V	
ThyA (EF1576)	Timidilato sintasa. Participa en la ruta de síntesis de las pirimidinas. (Hoff & Kristich 2016)
MEEAYLALGKKILEEGHFKEDRTGTGTYSLFGYQMRFDLAKGFPLLTTRKVPFGLIKSELLWFLKGD TNIRYLLER NNHIWDEWAFERYVKSADYQGPDMDFGHRVLQDPAFAEQYKEEHQKFC DAILNDAEFAEKY GELGNIYGAQ WRHWETKDG SFIDQLANVIEMIKTNPDSRRLIVSAWNPEDVPSMALPP C HTMFQFYVNEGKLS C QLYQRSADV FLGVPFNIASYALLTHLIAHETGLEVGEFVHTLGDAHLYQNHVEQMQEQLSREVR SFPTLVLPDKASVDFDME DIKVEGYDPHTIKAPIAV	

FolA (EF1577)	Dihidrofolato reductasa. Participa en la ruta de síntesis de las pirimidinas. (Hoff & Kristich 2016)
MLAAIWAQDEQGVIGKEGKLPWHLPNLDFKFFKEKTIHNTLVLGRATFEGMGCRPLPNRTTIVLTSNPDYQAEGV LVMHSVVEILAYADKYEGVTVIGGGSVVFKEKELIPACDVLRYRTMIHETFEFGDTFFPEIDWSVWEKVATVPGVVDEK NLYAHDYETYHRNDK	
RmlA/RfbA (EF2194)	Glucosa-1-fosfato timidililtransferasa. Interviene en la síntesis del polisacárido Epa. (Hoff & Kristich 2016)
MKGILAGGSGTRLYPLTKATSKQLMPIYDKPMIYPMSTLMLAGINEILIISTPEDTPRFESLFGDGHDLGIHIEYA VQESPDGLAQAFIIGEEFIGDSDVCLVLGDNIYGGGLSKMLQRAASKESGATVFGYHVNDPERFGVVEFDEEM RALSIEEKPAQPKSNYAVTGLYFYDNEVVEIAKGIKPSERGELEITDVNKVYLEKNKLSVEVMGRGFAWLDGTGTH ESLLEASTFIETIEKRQNLKVALEEIAYRMGYITKEQLVELAQPLKKNYGYQYLLRLAAE	
Rex (EF2638)	Represor <i>redox-sensing</i> . Su ausencia produce hiperresistencia a cefalosporinas en aerobiosis. (Djorić & Kristich 2015)
MKDQVIPKATARRLPLYRYLRMLHDTGKNKVSSTELSEAVQVDSATIRRDYSYFGEGLGKRGYGYDVENLMNFF AKTLNEDELTNVALIGVGNLGSALLKYKFHQSNIRVSAFDVNEDIVGRIVDGIPVYPMEDMMEQIRVQQIEVAIV TIPARKAQEVNKLAEAGVKGILNFTAARLVAPPEVLIQNVDLTNELQTLIYFLHHDNELIDEE	
Npr (EF1211)	NADHperoxidasa. Su interrupción produce susceptibilidad a cefalosporinas. (Rigottier-Gois <i>et al.</i> 2011)
MKVIVLGGSSHGGYEAVEELLNLHPDAEIQWYEEKGDFISFLSCGMQLYLEGKVKDVNSVRYMTGEKMESRGVNV FSNTEITAIQPKHEQVTVKDLVSGEERVENYDKLIISPGAVPFELDIPGKDLNIIYLMRGRQWAIKQKKTVDPEV NNVVVIGSGYIGIEAAEAFKAGKKTVIDILDRPLGVYLDKEFTDVLTEEMEANNITATGETVERYEGDGRVQKI VTDKNAYDADLVVAVGVRPNTAWLKGTLLEHPNGLIKTDEYMRTPSEPVDFAVGDATLIKYNPADTEVNIALATN ARKQGRFAVKNLEEPVKPFPGVQGSSGLAVFDYKFASTGINEVMAQKLGKETKAVTVVEDYLMDFNPDQKQA WFKLVYDPETTQILGAQLMSKADLTANINAISLAIQAKMTIEDLAYADFFFQPAFDKPWNIINTAALEAVKQER	

Tabla S5. Proteínas relacionadas con el estrés oxidativo en *Enterococcus* y otras candidatas a estar implicadas en el fenómeno H₂S-cefalosporinas, todas ellas conteniendo al menos una cisteína en su estructura aminoacídica.

PerR (EF1585)	Regulador transcripcional de la familia FUR. (Verneuil <i>et al.</i> 2005)
MDNVLVKNALAEKLANIRITPQRYAILEYLIENHTHTADEIYRALEDHFPNMSVATVYNNLRLFTFEGVQEMSY GDASSRFDFFSSKHYHVICQKCGKIVDFHYPGLEDVEMAASKLTGFEINEHRELYGLCPDQQAAQENV	
Spx (EF2678)	Regulador global, estrés oxidativo y virulencia. (Kajfasz <i>et al.</i> 2012)
MLTYTSPSCTSRKRARAWLQEHEIPFKERNIFSEPLNIEELKAILIMTEDGTTEEIISTRSKVVFQKLNMDLDELPLQ DLLELVQENPGLLRPIMIDEKRLQVGFNEDEIRRFLPRDVRQLELRQAQLMAGL	
Tpx (EF2932)	Tiol peroxidasa. (La Carbona <i>et al.</i> 2007)
MNVTRKGVHLELTGEQPKVGTAKPVFSLKLNLNQEIINLADYKGGKTVLISVVPDIDTRVCSLQTKRFNQEAALDGLG VQIITISNNTVEEQANWCAAEVEMEMMLHDTEDSFGAAYGLYIPEMGRALARAFVIDPEGLVYEEIVSEVSSEPD YQQALESARKV	

III. Análisis estadístico de los experimentos de fluorimetría

Tabla S6. Resultados de los experimentos de fluorimetría para la determinación de la sulfhidrilación interna de *E. faecalis* JH2-2 WT. El nivel de fluorescencia se representa en relación al observado en la cepa control (WT). De la muestra CEC+H₂S solo se pudieron tomar dos resultados.

Muestra	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Media	Desviación Estándar	Error Estándar
WT	1	1	1	1	0	0
H ₂ S	1,512	1,512	2,488	1,837	0,563	0,325
CTX	0,285	0,839	0,223	0,449	0,338	0,195
CEC	4,456	2,351	2,593	3,133	1,151	0,665

Tabla S7. Análisis de Varianza de los resultados anteriores.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	12,280	3			
Intra grupos	3,519	8	9,306	0,005	4,066
Total	15,799	11			

BIBLIOGRAFÍA

At the end of the day, we're part of a long-running story. We just try to get our paragraph right.

Barack Obama

The New Yorker, January 27, 2014

- Álvarez, R., Frávega, J., Rodas, P. I., Fuentes, J. A., Paredes-Sabja, D., Calderón, I. L., & Gil, F. (2015). Participation of *S. Typhimurium cysJIH* operon in the H₂S-mediated ciprofloxacin resistance in presence of sulfate as sulfur source. *Antibiotics*, 4(3), 321–328.
- Álvarez, R., Neumann, G., Frávega, J., Díaz, F., Tejías, C., Collao, B., ... Gil, F. (2015). CysB-dependent upregulation of the *Salmonella Typhimurium cysJIH* operon in response to antimicrobial compounds that induce oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(1), 46–51.
- Araújo, T. F., & Ferreira, C. L. de L. F. (2013). The genus *Enterococcus* as probiotic: Safety concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 457–466.
- Arbeloa, A., Segal, H., Hugonnet, J. E., Josseaume, N., Dubost, L., Brouard, J. P., ... Arthur, M. (2004). Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5-mediated beta-lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1221–1228.
- Archer, G. L., Niemeyer, D. M., Thanassi, J. A., & Pucci, M. J. (1994). Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(3), 447–454.
- Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature reviews. Microbiology*, 10(4), 266–278.
- Attene-Ramos, M. S. (2006). Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent. *Molecular Cancer Research*, 4(1), 9–14.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., ... Mori, H. (2006). Construction of *E. coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2, 2006.0008.
- Bang, S. W., Clark, D. S., & Keasling, J. D. (2000). Engineering hydrogen sulfide production and cadmium removal by expression of the thiosulfate reductase gene (*phsABC*) from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3939–3944.
- Barrett, E. L., & Clark, M. A. (1987). Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. *Microbiological Reviews*, 51(2), 192–205.
- Basic, A., Blomqvist, M., Dahlén, G., & Svensäter, G. (2017). The proteins of *Fusobacterium spp.* involved in hydrogen sulfide production from L-cysteine. *BMC Microbiology*, 17(1), 61.
- Baskar, R., & Bian, J. (2011). Hydrogen sulfide gas has cell growth regulatory role. *European Journal of Pharmacology*, 656(1–3), 5–9.
- Bäumler, A. J., & Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, 535(7610), 85–93.
- Baureder, M., Reimann, R., & Hederstedt, L. (2012). Contribution of catalase to hydrogen peroxide resistance in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiology Letters*, 331(2), 160–164.
- Blackstone, E., Morrison, M., & Roth, M. B. (2005). H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science*, 308 (5721), 518.
- Botello-Morte, L., Bes, M. T., Heras, B., Fernandez-Otal, A., Peleato, M. L., & Fillat, M. F. (2014). Unraveling the redox properties of the global regulator FurA from *Anabaena spp.* PCC 7120: disulfide reductase activity based on its CXXC motifs. *Antioxid Redox Signal*, 20(9), 1396–1406.
- Bouhss, A., Josseaume, N., Severin, A., Tabei, K., Hugonnet, J. E., Shlaes, D., ... Arthur, M. (2002). Synthesis of the L-alanyl-L-alanine cross-bridge of *Enterococcus faecalis* peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 45935–45941.
- Bradley, C. R., & Fraiese, A. P. (1996). Heat and chemical resistance of enterococci. *The Journal of Hospital Infection*, 34(3), 191–196.
- Cherepanov, P. P., & Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 158(1), 9–14.
- Chung, H. S., Wang, S. B., Venkatraman, V., Murray, C. I., & Van Eyk, J. E. (2013). Cysteine oxidative posttranslational modifications: Emerging regulation in the cardiovascular system. *Circulation Research*, 112(2), 382–392.
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Sayers, E. W. 2016. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), pp.D67–D72.
- Clarke, P. H. (1953). Hydrogen sulphide production by Bacteria. *Journal of General Microbiology*, 8(3), 397–407.

- CLSI. (2017). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. CLSI supplement M100. (27th ed., Vol. fifteenth).
- Comenge, Y., Quintiliani Jr, R., Li, L., Dubost, L., Brouard, J. P., Hugonnet, J. E., & Arthur, M. (2003). The CroRS two-component regulatory system is required for intrinsic beta-lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 185(24), 7184–7192.
- Cooper, C. E., & Brown, G. C. (2008). The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(5), 533–539.
- Darling, A. E., Mau, B., & Perna, N. T. (2010). ProgressiveMauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS ONE*, 5(6), e11147.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–6645.
- Deivanayagam, C.C.S. et al., 2000. Novel fold and assembly of the repetitive B region of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding surface protein. *Structure*, 8(1), pp.67–78.
- Depardieu, F., Mejean, V., Courvalin, P., Arias, C., Murray, B., Reynolds, P., ... Mazumdar, V. (2015). Competition between VanUG repressor and VanRG activator leads to rheostatic control of *vanG* vancomycin resistance operon expression. *PLoS Genetics*, 11(4), e1005170.
- Desbonnet, C., Tait-Kamradt, A., Garcia-Solache, M., Dunman, P., Coleman, J., Arthur, M., & Rice, L. B. (2016). Involvement of the eukaryote-like kinase-phosphatase system and a protein that interacts with penicillin-binding protein 5 in emergence of cephalosporin resistance in cephalosporin-sensitive class A penicillin-binding protein mutants in *Enterococcus faecium*. *mBio*, 7(2), 1–10.
- Devriese, L., Baele, M., & Butaye, P. (2006). The Genus *Enterococcus*: Taxonomy; *Enterococcus. Prokaryotes*, 4, 163–174.
- Djorić, D., & Kristich, C. J. (2015). Oxidative stress enhances cephalosporin resistance of *Enterococcus faecalis* through activation of a two-component signaling system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 159–169.
- Du, X., Hua, X., Qu, T., Jiang, Y., Zhou, Z., & Yu, Y. (2014). Molecular characterization of Rif^r mutations in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Chemotherapy*, 26(4), 217–221.
- Dubée, V., Triboulet, S., Mainardi, J. L., Ethève-Quelquejeu, M., Gutmann, L., Marie, A., ... Arthur, M. (2012). Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* L,D-transpeptidase Ldt Mt1 by carbapenems and cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(8), 4189–4195.
- Duez, C., Hallut, S., Rhazi, N., Hubert, S., Amoroso, A., Bouillenne, F., ... Coyette, J. (2004). The *ponA* gene of *Enterococcus faecalis* JH2-2 codes for a low-affinity class A penicillin-binding protein. *J Bacteriology*, 186(13), 4412–4416.
- Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., & Collins, J. J. (2010). Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 482–489.
- ECDC. (2015). *Antimicrobial Resistance surveillance in Europe*.
- EFSA. (2012). Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA Journal* 10(5), 2682.
- EFSA. (2013). Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, 11(11), 3449.
- Enne, V. I., Delsol, A. A., Roe, J. M., & Bennett, P. M. (2004). Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 203–207.
- EUCAST. (2017). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0*.
- Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 308–341.
- Ferrándiz, M. J., Ardanuy, C., Liñares, J., García-Arenzana, J. M., Cercenado, E., Fleites, A., ... Lin, J. (2005). New mutations and horizontal transfer of *rpoB* among rifampin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from four Spanish hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2237–2245.
- Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 1–24.

- Frankenberg, L., Brugna, M., & Hederstedt, L. (2002). *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase. *Journal of Bacteriology*, 184(22), 6351–6356.
- Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H., & Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47(1–2), 1–24.
- Franz, C. M. A. P., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif, N. M. K., Vancanneyt, M., Swings, J., & Holzapfel, W. H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4385–4389.
- Frávega, J., Álvarez, R., Díaz, F., Inostroza, O., Tejías, C., Rodas, P. I., ... Gil, F. (2016). *Salmonella* Typhimurium exhibits fluoroquinolone resistance mediated by the accumulation of the antioxidant molecule H₂S in a CysK-dependent manner. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(12), 3409–3415.
- Furchgott, R. F. (1999). Endothelium-Derived Relaxing Factor: discovery, early studies, and identification as Nitric Oxide (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 38(13–14), 1870–1880.
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373–376.
- Gardete, S., & Tomasz, A. (2014). Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(7), 2836–2840.
- Gerlach, R. G., Jäckel, D., Hölzer, S. U., & Hensel, M. (2009). Rapid oligonucleotide-based recombineering of the chromosome of *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1575–1580.
- Ghim, S. Y., Charles C, K., Bonner, E. R., D'Elia, J. N., Grabner, G. K., & Switzer, R. L. (1999). The *Enterococcus faecalis* *pyr* operon is regulated by autogenous transcriptional attenuation at a single site in the 5' leader. *Journal of Bacteriology*, 181(4), 1324–1329.
- Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., & Shankar, N. (2014). Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. *Book*.
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 163–171.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2–3), 215–222.
- Granier, S. A., Hidalgo, L., San Millan, A., Escudero, J. A., Gutierrez, B., Brisabois, A., & Gonzalez-Zorn, B. (2011). ArmA methyltransferase in a monophasic *Salmonella enterica* isolate from food. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5262–5266.
- Gusarov, I., Shatalin, K., Starodubtseva, M., & Nudler, E. (2009). Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science*, 325(5946), 1380–1384.
- Hall, C. L., Tschannen, M., Worthey, E. A., & Kristich, C. J. (2013). IreB, a Ser/Thr kinase substrate, influences antimicrobial resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(12), 6179–6186.
- E. Tacconelli, E., Magrini, N., Carmeli, Y., ... Theuretzbacher, U. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *World Health Organization*, February 2017.
- Harbut, M. B., Vilchèze, C., Luo, X., Hensler, M. E., Guo, H., Yang, B., ... Wang, F. (2015). Aurano-fin exerts broad-spectrum bactericidal activities by targeting thiol-redox homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(14), 4453–4458.
- Heinzinger, N. K., Fujimoto, S. Y., Clark, M. A., Moreno, M. S., & Barrett, E. L. (1995). Sequence analysis of the *phs* operon in *Salmonella* Typhimurium and the contribution of thiosulfate reduction to anaerobic energy metabolism. *Journal of Bacteriology*, 177(10), 2813–2820.
- Hinojosa-Leon, M., Dubourdieu, M., Sanchez-Crispin, J. A., & Chippaux, M. (1986). Tetrathionate reductase of *Salmonella* Typhimurium: A molybdenum containing enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 136(2), 577–581.
- Hochman, J., Blakley, B. W., Wellman, M., & Blakley, L. (2006). Prevention of aminoglycoside-induced sensorineural hearing loss. *The Journal of Otolaryngology*, 35(3), 153–156.
- Hoff, J. S., & Kristich, C. J. (2016). Thymidylate limitation potentiates cephalosporin activity toward enterococci via an exopolysaccharide-based mechanism. *ACS Chemical Biology*, 11(6), 1561–1568.
- Hoisington, A. J., Brenner, L. A., Kinney, K. A., Postolache, T. T., & Lowry, C. A. (2015). The microbiome of the built environment and mental health. *Microbiome*, 3(1), 60.

- Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*, 3(5), 421–433.
- Hourihan, J. M., Kenna, J. G., & Hayes, J. D. (2013). The gasotransmitter hydrogen sulfide induces *nrf2*-target genes by inactivating the Keap1 ubiquitin ligase substrate adaptor through formation of a disulfide bond between cys-226 and cys-613. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(5), 465–481.
- Huang, C. J., & Barrett, E. L. (1990). Identification and cloning of genes involved in anaerobic sulfite reduction by *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 4100–4102.
- Hughes, M. N., Centelles, M. N., & Moore, K. P. (2009). Making and working with hydrogen sulfide. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(10), 1346–1353.
- Jaffrey, S. R., & Snyder, S. H. (2001). The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2001(86), p11.
- Jones, R. T., Thai, L. P., & Silver, R. P. (1978). Genetic and molecular characterization of an *Escherichia coli* plasmid coding for hydrogen sulfide production and drug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14(5), 765–770.
- Jousselin, A., Kelley, W. L., Barras, C., Lew, D. P., & Renzoni, A. (2013). The *Staphylococcus aureus* Thiol/Oxidative stress global regulator Spx controls *trfA*, a gene implicated in cell wall antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3283–3292.
- Kabil, O., & Banerjee, R. (2010). Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 21903–21907.
- Kabil, O., Motl, N., & Banerjee, R. (2014). H₂S and its role in redox signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1844(8), 1355–1366.
- Kajfasz, J. K., Mendoza, J. E., Gaca, A. O., Miller, J. H., Koselny, K. A., Giambiagi-Demarval, M., ... Lemos, J. A. (2012). The Spx regulator modulates stress responses and virulence in *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*, 80(7), 2265–2275.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), pp.1647–1649.
- Keren, I., Wu, Y., Inocencio, J., Mulcahy, L. R., & Lewis, K. (2013). Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science*, 339(6124), 1213–1216.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5), 797–810.
- Kramer, A., Schwebke, I., & Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 6, 130.
- Kristich, C. J., Little, J. L., Hall, C. L., Hoff, J. S. (2011). Reciprocal regulation of cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. *mBio*, 2(6), pp.e00199-11.
- Kristich, C. J., & Little, J. L. (2012). Mutations in the beta subunit of RNA polymerase alter intrinsic cephalosporin resistance in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 2022–2027.
- La Carbona, S., Sauvageot, N., Giard, J. C., Benachour, A., Posteraro, B., Auffray, Y., ... Hartke, A. (2007). Comparative study of the physiological roles of three peroxidases (NADH peroxidase, Alkyl hydroperoxide reductase and Thiol peroxidase) in oxidative stress response, survival inside macrophages and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*, 66(5), 1148–1163.
- Le Breton, Y., Muller, C., Auffray, Y., & Rincé, A. (2007). New insights into the *E. faecalis* CroRS two-component system obtained using a differential-display random arbitrarily primed PCR approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3738–3741.
- Lecoq, L., Bougault, C., Triboulet, S., Dubée, V., Hugonnet, J. E., Arthur, M., & Simorre, J. P. (2014). Chemical shift perturbations induced by the acylation of *Enterococcus faecium* L,D-transpeptidase catalytic cysteine with ertapenem. *Biomolecular NMR Assignments*, 8(2), 339–343.
- Lee, Y. H., Nam, K. H., & Helmann, J. D. (2013). A mutation of the RNA polymerase B' subunit (*rpoC*) confers cephalosporin resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 56–65.
- Li, L., Whiteman, M., Guan, Y. Y., Neo, K. L., Cheng, Y., Lee, S. W., ... Moore, P. K. (2008). Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*, 117(18), 2351–2360.

- Li, Q., & Lancaster, J. R. (2013). Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide*, 35, 21–34.
- Liu, X., Gong, C., & Jiang, X. (2011). Inhibitory effects of enterococci on the production of hydrogen sulfide by hydrogen sulfide-producing bacteria in raw meat. *Journal of Applied Microbiology*, 111(1), 83–92.
- Liu, Y., & Imlay, J. A. (2013). Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science*, 339(6124), 1210–1213.
- Ljungdahl, L. G., Adams, M. W., Barton, L. L., Ferry, J. G., & Johnson, M. K. (2003). *Biochemistry and Physiology of Anaerobic Bacteria*. Springer-Verlag.
- Luhachack, L., & Nudler, E. (2014). Bacterial gasotransmitters: an innate defense against antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 21, 13–17.
- Lund, M. E., Matsen, J. M., & Blazevic, D. J. (1974). Biochemical and antibiotic susceptibility studies of H₂S-negative *Citrobacter*. *Applied Microbiology*, 28(1), 22–25.
- MacCallum, W. G., & Hastings, T. J. (1899). Endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes*. *J Exp Med*, 4(5-6), 521–534.
- Madigan, M. T., & Martinko, J. M. (2006). *Brock Biology of Microorganisms* (11th, Int. ed.). Pearson Education International.
- Mainardi, J. L., Fourgeaud, M., Hugonnet, J. E., Dubost, L., Brouard, J. P., Ouazzani, J., ... Arthur, M. (2005). A novel peptidoglycan cross-linking enzyme for a β -lactam-resistant transpeptidation pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38146–38152.
- Marks, G. S., Brien, J. F., Nakatsu, K., & McLaughlin, B. E. (1991). Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(5), 185–188.
- Miller, D. L., & Roth, M. B. (2007). Hydrogen sulfide increases thermotolerance and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), 20618–20622.
- Módis, K., Panopoulos, P., Coletta, C., Papapetropoulos, A., Szabo, C. (2013). Hydrogen sulfide-mediated stimulation of mitochondrial electron transport involves inhibition of the mitochondrial phosphodiesterase 2A, elevation of cAMP and activation of protein kinase A. *Biochemical Pharmacology*, 86(9), pp.1311–1319.
- Montoya, L. A., Pearce, T. F., Hansen, R. J., Zakharov, L. N., & Pluth, M. D. (2013). Development of selective colorimetric probes for hydrogen sulfide based on nucleophilic aromatic substitution. *The Journal of Organic Chemistry*, 78(13), 6550–6557.
- Mundy, L. M., Sahm, D. F., & Gilmore, M. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 513–522.
- Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S. K., ... Snyder, S. H. (2009). H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Science Signaling*, 2(96), ra72.
- Ni, Z.-J., Hu, K.-D., Song, C.-B., Ma, R.-H., Li, Z.-R., Zheng, J.-L., ... Zhang, H. (2016). Hydrogen sulfide alleviates postharvest senescence of grape by modulating the antioxidant defenses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 4715651.
- Nikaido, H., Liu, W., & Rosenberg, E. Y. (1990). Outer membrane permeability and β -lactamase stability of dipolar ionic cephalosporins containing methoxyimino substituents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(2), 337–342.
- Ono, K., Akaike, T., Sawa, T., Kumagai, Y., Wink, D. A., Tantillo, D. J., ... Fukuto, J. M. (2014). Redox chemistry and chemical biology of H₂S, hydropersulfides, and derived species: Implications of their possible biological activity and utility. *Free Radical Biology & Medicine*, 77, 82–94.
- Palmer, K. L. & Gilmore, M. S., 2010. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *mBio*, 1(4), pp.e00227-10.
- Papapetropoulos, A. (2015). All H₂S donors are not created equal. *Nitric Oxide*, 47(2015), S8.
- Park, C. M., Macinkovic, I., Filipovic, M. R., & Xian, M. (2015). Use of the “tag-switch” method for the detection of protein S-sulfhydration. *Methods in Enzymology*, 555, 39–56.
- Paul, B. D., & Snyder, S. H. (2012a). H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(8), 499–507.
- Paul, B. D., & Snyder, S. H. (2012b). The conversion of H₂S to sulfane sulfur: author's response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(12), 803–803.
- Paul, B. D., & Snyder, S. H. (2015). H₂S: A novel gasotransmitter that signals by sulfhydration. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(11), 687–700.
- Paulsen, C. E., & Carroll, K. S. (2013). Cysteine-mediated redox signaling: Chemistry, biology, and tools for discovery. *Chemical Reviews*, 113(7), 4633–4679.

- Paulsen, I. T., Banerjee, L., Myers, G. S., Nelson, K. E., Seshadri, R., Read, T. D., ... Fraser, C. M. (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, 299(5615), 2071–2074.
- Pollmann, M., Nordhoff, M., Pospischil, A., Tedin, K., & Wieler, L. H. (2005). Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural *Chlamydia* infection in swine. *Infection and Immunity*, 73(7), 4346–4353.
- Price-Carter, M., Tingey, J., Bobik, T. A., & Roth, J. R. (2001). The alternative electron acceptor tetrathionate supports B12-dependent anaerobic growth of *Salmonella* Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. *Journal of Bacteriology*, 183(8), 2463–2475.
- Prousek, J. (2007). Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure and Applied Chemistry*, 79(12), 2325–2338.
- Revsbech, I. G., Shen, X., Chakravarti, R., Jensen, F. B., Thiel, B., Evans, A. L., ... Fago, A. (2014). Hydrogen sulfide and nitric oxide metabolites in the blood of free-ranging brown bears and their potential roles in hibernation. *Free Radical Biology and Medicine*, 73, 349–357.
- Riboulet, E., Verneuil, N., La Carbona, S., Sauvageot, N., Auffray, Y., Hartke, A., & Giard, J. C. (2007). Relationships between oxidative stress response and virulence in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(1–3), 140–146.
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1079–1081.
- Rice, L. B., Carias, L. L., Rudin, S., Hutton, R., Marshall, S., Hassan, M., ... Arthur, M. (2009). Role of Class A Penicillin-Binding Proteins in the expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3649–3656.
- Rigottier-Gois, L., Alberti, A., Houel, A., Taly, J. F., Palcy, P., Manson, J., ... Serror, P. (2011). Large-scale screening of a targeted *Enterococcus faecalis* mutant library identifies envelope fitness factors. *PLoS One*, 6(12), e29023.
- Ryter, S. W., Morse, D., & Choi, A. M. K. (2004). Carbon Monoxide: To boldly go where NO has gone before. *Science Signaling*, 2004(230), re6.
- Sacco, E., Cortes, M., Josseume, N., Rice, L. B., Mainardi, J.-L., & Arthur, M. (2014). Serine / Threonine protein phosphatase-mediated control of the peptidoglycan cross-linking L,D-transpeptidase pathway in *Enterococcus faecium*. *mBio*, 5(4), e01446-14.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 234–258.
- Schleifer, K. H., & Kilpper-Balz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(1), 31–34.
- Scuffi, D., Lamattina, L., & García-Mata, C. (2016). Gasotransmitters and stomatal closure: Is there redundancy, concerted action, or both? *Frontiers in Plant Science*, 7(2), 277.
- Scuffi, D., Álvarez, C., Laspina, N., Gotor, C., Lamattina, L., & Garcia-Mata, C. (2014). Hydrogen sulfide generated by L-cysteine desulfhydrase acts upstream of nitric oxide to modulate abscisic acid-dependent stomatal closure. *Plant Physiology*, 166(4), 2065–2076.
- Shannon, D. A., & Weerapana, E. (2014). Orphan PTMs: Rare, yet functionally important modifications of cysteine. *Biopolymers*, 101(2), 156–164.
- Shatalin, K., Shatalina, E., Mironov, A., & Nudler, E. (2011). H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*, 334(6058), 986–990.
- Shen, X., Carlstrom, M., Borniquel, S., Jadert, C., Kevil, C. G., & Lundberg, J. O. (2013). Microbial regulation of host hydrogen sulfide bioavailability and metabolism. *Free Radical Biology & Medicine*, 60, 195–200.
- Sievert, D., Boulton, M., Stoltman, G., Johnson, D., Stobierski, M., Downes, F., ... Rudrik, J. (2002). *Staphylococcus aureus* Resistant to Vancomycin --- United States, 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 51(26), 565–567.
- Sifaoui, F., Arthur, M., Rice, L., & Gutmann, L. (2001). Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2594–2597.
- Sifri, C.D., Mylonakis, E., Singh, K. V., Qin, X., Garsin, D. A., Murray, B. E., Calderwood, S. B., 2002. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infection and immunity*, 70(10), pp.5647–5650.
- Stanier, R. Y., Villanueva, J. R., & Guerrero, R. (2005). *Microbiología*. Reverté, D.L.

- Stefka, A. T., Feehley, T., Tripathi, P., Qiu, J., McCoy, K., Mazmanian, S. K., ... Nagler, C. R. (2014). Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *PNAS*, *111*(36), 13145–13150.
- Stoffels, L., Krehenbrink, M., Berks, B. C., & Uden, G. (2012). Thiosulfate reduction in *Salmonella enterica* is driven by the proton motive force. *Journal of Bacteriology*, *194*(2), 475–485.
- Svec, P., & Devriese, L. (2015). *Enterococcus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–25). Bergey's Manual Trust. Digital Ed.
- Szybalski, W., & Bryson, V. (1952). Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *Journal of Bacteriology*, *64*(4), 489–499.
- Tanner, F. W. (1917). Studies on the bacterial metabolism of sulfur. *Journal of Bacteriology*, *2*(5), 585–593.
- Tariq, M., Bruijs, C., Kok, J., & Krom, B. P. (2012). Link between culture zeta potential homogeneity and Ebp in *E. faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(7), 2282–2288.
- Tassios, P. T., Gazouli, M., Tzelepi, E., Milch, H., Kozlova, N., Sidorenko, S., ... Tzouveleki, L. S. (1999). Spread of a *Salmonella* Typhimurium clone resistant to expanded-spectrum cephalosporins in three European countries. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(11), 3774–3777.
- Thangamani, S., Mohammad, H., Abushahba, M. F. N., Sobreira, T. J. P., Hedrick, V. E., Paul, L. N., & Seleem, M. N. (2016). Antibacterial activity and mechanism of action of auranofin against multi-drug resistant bacterial pathogens. *Scientific Reports*, *6*, 22571.
- Toh, M. C., & Allen-Vercoe, E. (2015). The human gut microbiota with reference to autism spectrum disorder: considering the whole as more than a sum of its parts. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *26*, 26309.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, J., Cucarella, C., Lamata, M., ... Lasa, I. (2001). The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* *67*(10), 4538–4545.
- Toohey, J. I. (2011). Sulfur signaling: Is the agent sulfide or sulfane? *Analytical Biochemistry*, *413*, 1–7.
- Toohey, J. I. (2012). The conversion of H₂S to sulfane sulfur. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(12), 803.
- Turnbough, C. L., & Switzer, R. L. (2008). Regulation of pyrimidine biosynthetic gene expression in bacteria: repression without repressors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: *72*(2), 266–300.
- Ubeda, C., Taur, Y., Jenq, R. R., Equinda, M. J., Son, T., Samstein, M., ... Pamer, E. G. (2010). Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(12), 4332–4341.
- Vergis, E. N., Shankar, N., Chow, J. W., Hayden, M. K., Snyderman, D. R., Zervos, M. J., ... Muder, R. R. (2002). Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clinical Infectious Diseases*, *35*(5), 570–575.
- Verneuil, N., Maze, A., Sanguinetti, M., Laplace, J. M., Benachour, A., Auffray, Y., ... Hartke, A. (2006). Implication of (Mn)superoxide dismutase of *Enterococcus faecalis* in oxidative stress responses and survival inside macrophages. *Microbiology*, *152*(Pt 9), 2579–2589.
- Verneuil, N., Rincé, A., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Fadda, G., Auffray, Y., ... Giard, J. C. (2005). Contribution of a PerR-like regulator to the oxidative-stress response and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Microbiology*, *151*(12), 3997–4004.
- Vesic, D., & Kristich, C. J. (2012). MurAA is required for intrinsic cephalosporin resistance of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(5), 2443–2451.
- Vesic, D., & Kristich, C. J. (2013). A Rex family transcriptional repressor influences H₂O₂ accumulation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, *195*(8), 1815–1824.
- Walsh, C. (2013). Antibiotics: Actions, origins, resistance (Vol. 95). *ASM Press*.
- Wang, R. U. I. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB Journal*, *16*(13), 1792–1798.
- Wang, X., & Zhao, X. (2009). Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(4), 1395–1402.
- Wedmann, R., Bertlein, S., Macinkovic, I., Böltz, S., Miljkovic, J. L., Muñoz, L. E., ... Filipovic, M. R. (2014). Working with “H₂S”: Facts and apparent artifacts. *Nitric Oxide*, *41*, 85–96.

- Wedmann, R., Onderka, C., Wei, S., András Szijártó, I., Miljkovic, J., Femic, A., ... Filipovic, M. (2016). Improved tag-switch method reveals that thioredoxin acts as depersulfidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation. *Chemical Science*, 3414–3426.
- Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., ... Sievert, D. M. (2016). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 14(1), 1–14.
- Werner, G., Coque, T. M., Franz, C. M. A. P., Grohmann, E., Hegstad, K., Jensen, L., ... Weaver, K. (2013). Antibiotic resistant enterococci—Tales of a drug resistance gene trafficker. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 360–379.
- Williams, E., Pead, S., Whiteman, M., Wood, M. E., Wilson, I. D., Lodomery, M., ... Hancock, J. (2015). Detection of thiol modifications by hydrogen sulfide. *Methods in Enzymology*, 555, 233–251.
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., ... Bäumlér, A. J. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*, 467(7314), 426–429.
- Xu, X., Lin, D., Yan, G., Ye, X., Wu, S., Guo, Y., ... Wang, M. (2010). *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4643–4647.
- Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., ... Wang, R. (2008). H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*, 322(5901), 587–90.
- Zhang, D., Macinkovic, I., Devarie-Baez, N. O., Pan, J., Park, C. M., Carroll, K. S., ... Xian, M. (2014). Detection of protein S-sulfhydration by a tag-switch technique. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 53(2), 575–581.
- Zhang, X., Paganelli, F. L., Bierschenk, D., Kuipers, A., Bonten, M. J., Willems, R. J., & van Schaik, W. (2012). Genome-wide identification of ampicillin resistance determinants in *Enterococcus faecium*. *PLoS Genetics*, 8(6), e1002804.
- Zhao, K., Ju, Y., Li, S., Altaany, Z., Wang, R., & Yang, G. (2014). S-sulfhydration of MEK 1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair. *EMBO reports* 15(7), 792–800.
- ZoBell, C. E., & Feltham, C. B. F. (1934). A comparison of lead, bismuth, and iron as detectors of Hydrogen Sulphide produced by Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 28(2), 169–176.

Actualmente, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* son dos de los principales patógenos nosocomiales a nivel mundial, produciendo cuadros de endocarditis, infecciones urinarias y septicemias. Este hecho se debe, entre otras razones, a su elevada resistencia a condiciones adversas del medio y a multitud de antibióticos.

Entre los mecanismos que presentan los enterococos para resistir a los antimicrobianos, el de mayor trascendencia clínica es su resistencia intrínseca a las cefalosporinas (un valioso grupo de antibióticos perteneciente a la familia de los beta-lactámicos), lo que conlleva una limitación de las opciones terapéuticas disponibles para combatir las infecciones por estas especies.

En la presente Tesis Doctoral, hemos descubierto un fenómeno que anula la resistencia exhibida por *Enterococcus*, volviéndole susceptible a la acción de las cefalosporinas. Esto ocurre cuando los enterococos son expuestos a la presencia del gas ácido sulfhídrico, abreviado como H₂S.

Este gas, considerado durante siglos como un metabolito celular de desecho, está reconocido hoy como un gasotransmisor de gran importancia, regulando diferentes procesos fisiológicos y patológicos en Eucariotas así como en Procariotas.

Profundizando en nuestro trabajo, hemos encontrado que, *Enterococcus* no solo se vuelve sensible a las cefalosporinas al añadir H₂S al medio, sino que el mismo resultado tiene lugar cuando el H₂S es producido y excretado por otra bacteria, incluso aunque ambas especies se sitúen físicamente separadas entre sí.

Por tanto, en esta Tesis se presentan avances importantes en dos temas.

Por un lado, el hecho de que *Enterococcus* sea susceptible a la combinación de las cefalosporinas con el H₂S abre la puerta al diseño de futuras alternativas terapéuticas frente a patógenos multirresistentes.

