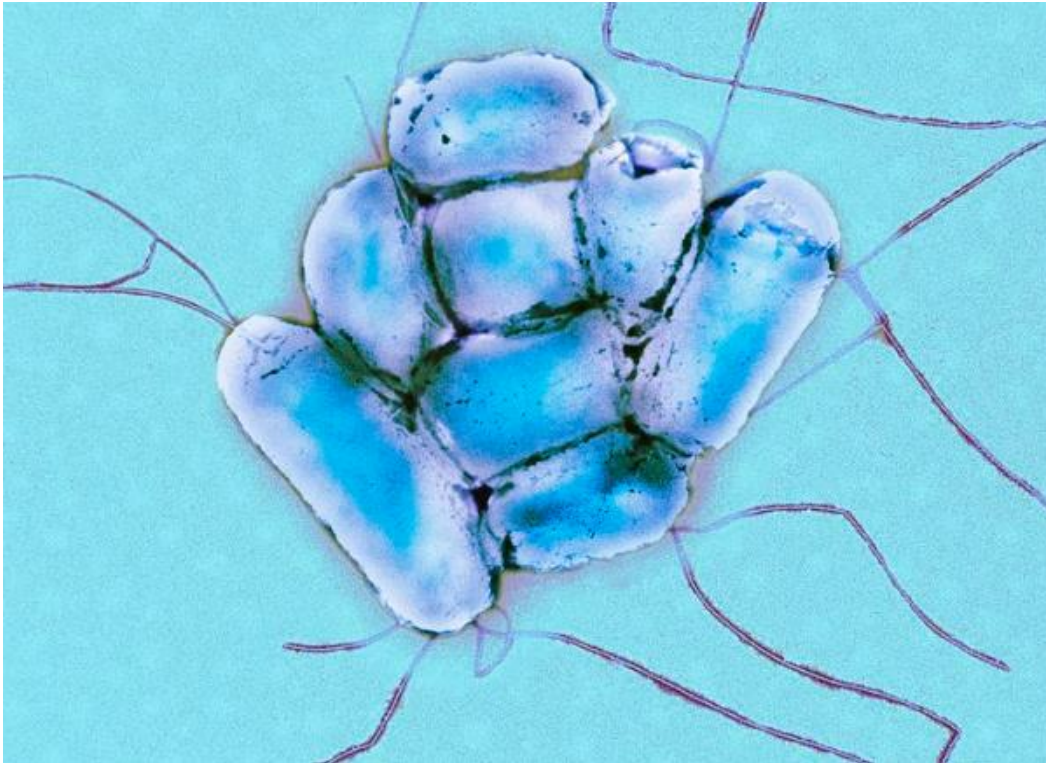


Trabajo de Fin de Grado

Creación de una red de regulación bacteriana de
respuesta a antibióticos



Creation of a bacterial regulatory network of response
to antibiotics

Alumno: Santiago Miguel Ortega Ferris

Tutor: Guido Santos Rosales

Universidad de La Laguna, 2020

Facultad de Ciencias. Sección de Biología

Índice

Resumen	1
Abstract.....	1
Introducción.....	2
Redes moleculares como herramienta en biomedicina.	6
Justificación.....	8
Hipótesis	8
Objetivo	8
Material y Métodos.....	9
Búsqueda y selección de artículos.	9
Software y bases de datos.	9
Análisis de redes.....	10
Resultados.....	12
Discusión	25
Conclusiones	27
Conclusions	27
Referencias:	28

Resumen

La resistencia múltiple a antibióticos es un grave problema que pone en peligro todos los avances alcanzados en la lucha frente a las infecciones microbianas. Gran parte del origen de este problema es la exposición a concentraciones sub inhibitorias de antibióticos, ya que dichas concentraciones inducen a la adaptación frente a los antibióticos mediante cambios en la regulación y expresión génica de las bacterias. Dicha regulación génica se puede expresar mediante el uso de herramientas bioinformáticas que permiten representar interacciones proteína-proteína con el fin de obtener una comprensión generalizada de los efectos de las concentraciones *sub-MIC* en la resistencia bacteriana a los antibióticos. En este trabajo de fin de grado se han realizado dos redes de interacciones proteína-proteína (una red interacciones conocidas y otra de interacciones predichas) en *Escherichia coli* con el objetivo de dilucidar que antibióticos pueden afectar a qué genes y de qué manera. Dichas redes han demostrado la falta de conocimiento sobre la resistencia frente a antibióticos y evidencian la necesidad de realizar investigaciones que permitan dilucidar con más detalle cómo influyen los niveles sub-MIC en la regulación génica, las interacciones proteína-proteína que regulan la resistencia a antibióticos y qué combinación de fármacos pueden ser empleados para paliar el problema de la resistencia a antibióticos.

Abstract

Multiple resistance to antibiotics is a serious problem that jeopardizes all the advances made in the fight against microbial infections. Much of the origin of this problem is exposure to sub-inhibitory concentrations of antibiotics, since these concentrations induce adaptation to antibiotics through changes in the gene regulation and expression of bacteria. Said gene regulation can be expressed through the use of bioinformatic tools that make it possible to represent protein-protein interactions in order to understand the effects of *sub-MIC* concentrations on bacterial resistance to antibiotics. In this end-of-grade project, two networks of protein-protein interactions (one network of known interactions and the other of predicted interactions) have been carried out in *Escherichia coli* with the aim of elucidating which antibiotics may affect which genes and in what way. These networks have demonstrated the lack of knowledge about resistance to antibiotics and show the need to carry out research that allows us to elucidate in more

detail how sub-MIC levels influence gene regulation, the protein-protein interactions that regulate antibiotic resistance and what combination of drugs can be used to alleviate the problem of antibiotic resistance.

Introducción

Los antibióticos son fármacos de vital importancia en la medicina moderna. Gracias a su uso extendido y generalizado, innumerables infecciones bacterianas son superadas con éxito; sin embargo, los especialistas llaman la atención sobre el peligro que supone el uso excesivo y sin control de los mismos ya que se ha hecho notorio que ello conlleva el surgimiento de patógenos bacterianos resistentes a múltiples fármacos (MDR, Multiple drug resistance) [1-2-3]. Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha venido alertando sobre esta situación en innumerables ocasiones, llegando a reconocer el gran problema que supone la resistencia frente a los antibióticos en 2015 en su 68ª Asamblea Mundial de la Salud. En consecuencia, se adoptó un Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos que incluyó, entre otros, la publicación en 2017 de las “Directrices de la OMS sobre el uso de antimicrobianos de importancia médica en animales destinados a la producción de alimentos”. Se colocaba así el foco sobre un hecho que pone en grave riesgo el control de las infecciones y por lo tanto la salud de los pacientes y de los sistemas de salud involucrados en su seguimiento: el peligro que conlleva la pérdida de eficacia de ciertos antibióticos podría conducir a un espiral que amerite el desarrollo de nuevos antibióticos que, si no se suministran adecuadamente, perderían sus beneficios [4]. Este hecho sitúa la resistencia a los antibióticos por parte de bacterias patógenas como uno de los principales riesgos de salud pública a los que nos enfrentamos en el presente siglo todavía sin solución clara [1].

Cuando los antibióticos se introdujeron por primera vez en la medicina, la dosificación era relativamente simple, el objetivo era una dosis terapéutica sin tener un efecto tóxico en el paciente. En los inicios de la investigación sobre la susceptibilidad bacteriana frente a antibióticos se introdujo un concepto fundamental, la concentración inhibitoria mínima o en inglés *minimum inhibitory concentration (MIC)*. Esta se define como la concentración más baja de fármaco que, en condiciones *in vitro* establecidas, inhibe el crecimiento poblacional visible de una bacteria objetivo. El fundamento básico de la

dosificación de antibióticos implica mantener una concentración del antibiótico superior a la *MIC* en el cuerpo del paciente el tiempo suficiente para eliminar la infección. Se mide en condiciones estandarizadas *in vitro* (esto es, un medio de crecimiento definido con un tamaño de inóculo concreto, y temperatura de incubación y duración establecidos) usando dos pasos de dilución del fármaco y la posterior evaluación visual del crecimiento bacteriano como resultado [1].

Con el paso de las décadas, la frecuencia de especies resistentes a antibióticos fue aumentando, hasta que se reconoció como un problema [1]. Desde entonces los procesos de selección y los mecanismos subyacentes de los fenotipos de alta resistencia se convirtieron, comprensiblemente, en centro de atención de los investigadores. Debido al enfoque de investigación inicial frente al abordaje de cepas de alta resistencia, se supuso que la resistencia clínicamente relevante surgía como resultado de la exposición bacteriana a concentraciones de antibióticos superiores a la *MIC*, mientras que el efecto de los antibióticos a concentraciones inferiores a la *MIC* (*sub-MIC* o subletales) para seleccionar mutantes fue ignorado [3-5].

Por definición, los antibióticos en condiciones de *sub-MIC* permiten el crecimiento de cepas susceptibles al antibiótico en cuestión, lo que a veces resulta en una tasa de crecimiento reducida en comparación con la tasa de crecimiento que se observa en ausencia del medicamento [1]. Desde hace unos 70 años aproximadamente, los humanos han producido y utilizado antibióticos en grandes cantidades, de manera industrial bien sea para uso medicinal o bien para la ganadería. Así, tanto el uso humano como la biosíntesis y liberación natural de los antibióticos genera gradientes de antibióticos (incrementos o disminuciones de la concentración de antibiótico que se puede observar en dos lugares distintos, por ejemplo, en dos tejidos adyacentes) en el cuerpo de pacientes y en el medio ambiente, lo que resulta en una exposición frente a niveles superiores e inferiores de *MIC* [1].

El crecimiento continuo de tales cepas en presencia de niveles de antibióticos en condiciones de *sub-MIC* es un aspecto crucial de la actual crisis de resistencia a los antibióticos ya que estas concentraciones de medicamentos se encuentran en muchos entornos naturales (como aguas residuales y lodos, ríos, lagos e incluso agua potable) [6-7]. Además se ha observado que podemos encontrar condiciones *sub-MIC* en

pacientes o en animales de consumo humano durante el tratamiento con antibióticos por las infecciones que puedan padecer [8-9].

Estudios recientes han demostrado que estas bajas concentraciones de antibióticos ejercen sus efectos en al menos tres niveles diferentes: como selectores de resistencia (al enriquecer las bacterias resistentes preexistentes y al seleccionar la resistencia *de novo*); como generadores de variabilidad genética y fenotípica (al aumentar la tasa de evolución adaptativa, incluido el desarrollo de resistencia); y como moléculas de señalización (que influyen en diversas actividades fisiológicas, incluida la virulencia, la formación de biopelículas y la expresión génica) [10-11].

Algunos experimentos han demostrado que las concentraciones de antibióticos extremadamente bajas (en el rango de ng por ml) pueden seleccionar cepas resistentes. Las concentraciones de antibióticos en el rango de ng por ml a µg por ml están muy extendidas en los entornos naturales y a menudo están asociadas con las aguas residuales humanas, la escorrentía de las actividades ganaderas y los efluentes de las plantas industriales. En consecuencia, además de la selección de cepas resistentes durante la terapia clínica, es probable que la selección de la resistencia a los antibióticos en entornos *ex vivo* contribuya a la emergencia generalizada de la resistencia bacteriana a gran escala [12-13].

El espacio mutacional, *mutacional space*, se define como todas las posibles mutaciones que pueden producir un fenotipo específico. En condiciones de *sub-MIC* el espacio mutacional es mucho mayor que en condiciones letales de antibióticos [14]. Cuando fenotipos salvajes son expuestos a concentraciones letales de antibióticos solo son capaces de sobrevivir aquellos mutantes preexistentes que poseían alta resistencia frente a antibióticos, mientras que el resto de la población muere [15]. En cambio, en poblaciones expuestas a antibióticos en condiciones *sub-MIC* se inhibe el crecimiento poblacional, pero no son eliminadas. A medida que la mayoría de la población sobrevive, la selección no letal da como resultado la aparición de una gama más amplia de variantes mutantes, particularmente variantes que tienen mutaciones de alta frecuencia. En relación con el punto anterior, la selección en condiciones *sub-MIC* también tiende a ser progresiva y está fuertemente asociada con mutaciones que tienen un bajo coste

energético [16], es por ello, que en condiciones *sub-MIC* el espacio mutacional es mayor que en condiciones letales de fármacos.

La naturaleza progresiva de la evolución bajo la selección en condiciones *sub-MIC* surge cuando tales mutaciones de bajo coste energético (por ejemplo, duplicaciones y amplificaciones) ocurren típicamente en una frecuencia alta. Estas mutaciones, de bajo coste energético con selección en condiciones *sub-MIC* son una consecuencia predecible de la naturaleza de la selección y la evolución bajo una presión selectiva débil. Esto se debe a que los antibióticos perturban la dinámica de la competición en una población mixta (cultivos que contienen más de un tipo de organismo en medio estéril, como agar) al reducir la tasa de crecimiento de la cepa de tipo salvaje susceptible en relación con la del mutante resistente. Para competir con la cepa de tipo salvaje, un mutante resistente que lleva una mutación de alto coste energético requiere una mayor concentración de antibiótico para suprimir suficientemente el crecimiento de tipo salvaje, en relación con la concentración que requiere un mutante de bajo costo energético [17].

Por último, el agente selectivo, es decir, los antibióticos en condiciones *sub-MIC*, también puede modular la velocidad a la que se producen mutantes resistentes al afectar las tasas de transferencia horizontal de genes (HGT), recombinación y mutagénesis. Dichos efectos moduladores son menos importantes en concentraciones letales de fármacos, ya que las células susceptibles se eliminan típicamente antes de que se exprese cualquier fenotipo asociado [1].

Es importante destacar que no solo los antibióticos tienen la capacidad de alterar las *MIC* de las bacterias, pues diversas investigaciones han demostrado que concentraciones de distintos fármacos, no utilizados tradicionalmente como antibióticos, pueden afectar la regulación génica frente a la resistencia a antibióticos. Este es el caso de la fluoxetina, un antidepresivo, ya que se ha visto que en determinadas concentraciones tiene capacidad antimicrobiana *in vitro* frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* [18]. Esto abre la puerta a la investigación de fármacos de diversos usos como posibles nuevos antibióticos. Es por ello que resulta fundamental conocer los efectos de sus concentraciones *sub-MIC* sobre la regulación génica en bacterias patógenas.

Redes moleculares como herramienta en biomedicina.

Las proteínas y sus interacciones funcionales forman la columna vertebral de la maquinaria celular. Su red de conectividad debe tomarse en cuenta para la plena comprensión de los fenómenos biológicos [19]. De allí que consideremos la importancia de los aportes de la ciencia de redes para el estudio de la recopilación, gestión, análisis, interpretación y presentación de datos relacionados entre sí, así como de los modelos de red elaborados en consecuencia; modelos que deben verse como una representación de red de algo, ya sean estas redes biológicas, telecomunicaciones, informáticas, etc.

En el caso que nos ocupa, la red molecular de conectividad está formada por interacciones proteína-proteína, estas se entienden comúnmente como contactos físicos con acoplamiento molecular entre proteínas que ocurren en una célula o en un organismo *in vivo*. Cualquier proteína en el ribosoma o en el aparato transcripcional basal comparte un contacto funcional con las otras proteínas en el complejo, pero ciertamente, no todas las proteínas en el complejo particular interactúan [19]. Ejemplos de estas interacciones son: las proteínas que interactúan para formar parte de un complejo proteínico, las que participan en el transporte de otras proteínas, y las que interactúan brevemente con otras proteínas para modificarlas (fosforilación), etc. El contacto físico en las interacciones proteína-proteína debe ser específico, esto es, que no se dé por azar [20].

La definición de interacciones proteína-proteína tiene que considerar (1º) la interfaz de interacción debe ser intencional y no accidental, es decir, el resultado de eventos/fuerzas biomoleculares específicos; y (2º) la interfaz de interacción debe ser no genérica, es decir, desarrollada para un propósito específico distinto de funciones totalmente genéricas como la producción de proteínas, la degradación y otras. Que las interacciones proteína-proteína impliquen contacto físico entre proteínas no significa que dichos contactos sean estáticos o permanentes [20].

Los elementos mencionados tales como fármacos, genes e interacciones proteína-proteína, forman parte de una red bioquímica. Su representación se define en muchos casos a través de un isomorfismo, es decir, un mapeo uno a uno entre estructuras que preservan las relaciones, un fenómeno no se puede representar directamente, sino que

primero debe conceptualizarse, esto es, ver de manera simplificada un elemento de la realidad que contiene entidades relacionadas entre ellas [21].

Para una comprensión completa de los sistemas biológicos complejos, como las células, los tejidos, los organismos o incluso los ecosistemas, no es suficiente identificar y caracterizar los componentes básicos individuales del sistema. También es necesario obtener una visión completa de las interacciones entre moléculas, vías, células, órganos y especies individuales. Sin embargo, debido a la naturaleza de las interacciones entre los componentes, la gran cantidad de datos y las no linealidades inherentes en la dinámica de los elementos individuales, los patrones de interacción y la organización funcional de los sistemas biológicos son difíciles de evaluar. La teoría moderna de redes complejas ha demostrado ser una clave muy eficaz para comprender estas arquitecturas complejas. El análisis de redes es beneficioso porque puede facilitar la identificación de patrones complejos, y a menudo emergentes, y puede proporcionar hipótesis para las relaciones entre la estructura y la función en muchos sistemas y en diferentes escalas [22].

A nivel subcelular es posible caracterizar y examinar diferentes redes moleculares, como las redes de regulación génica, la interacción de proteínas y las redes de regulación metabólica, para comprender cómo los diferentes componentes e interacciones entre ellos determinan la función de esta maquinaria enormemente compleja [23].

Las herramientas de la ciencia de redes no solo han demostrado ser capaces de descubrir con éxito la organización interna y la evolución de la célula, sino que también pueden mejorar gradualmente nuestra comprensión de la patogénesis de enfermedades como el cáncer. Una anomalía en un gen específico se propaga a lo largo de los enlaces de la red molecular y perturba múltiples procesos moleculares en todo el conjunto de interacciones moleculares en una célula [24].

Los primeros estudios se llevaron a cabo en las llamadas redes contextuales de interacciones de especies, las redes tróficas, uno de los principales temas de la investigación en ecología, en los que se ha descrito una topología compleja y con un nivel bastante alto de variabilidad en las estructuras de las redes [25]. Además, el

concepto de red también se ha aplicado a otros tipos de interacciones de especies, como las redes de polinización [25].

La teoría de redes moderna se utiliza cada vez más en neurociencia para comprender la fisiología y la anatomía neuronal a diferentes escalas. Los primeros esfuerzos se llevaron a cabo a nivel anatómico microscópico de neuronas individuales. Se ha prestado incluso más atención en el contexto de posibles aplicaciones clínicas y al estudio de la topología de la red cerebral [24].

Justificación

Es fundamental conocer estos nuevos fenotipos, especialmente en bacterias de interés clínico, ya que éstos se rigen por una red bioquímica grande y altamente interconectada que contiene una gran variedad de circuitos transcripcionales, de señalización y metabólicos que les otorga una mayor resistencia frente a antibióticos [26]. De allí que para poder comprender más estas relaciones metabólicas se han desarrollado herramientas bioinformáticas para visualizar redes de interacción molecular e integrarse con perfiles de expresión génica.

Hipótesis

Condiciones *sub-MIC* de fármacos inciden en la regulación génica de resistencia frente a antibióticos y pueden afectar a las mismas redes bioquímicas, afectando a los mismos genes de manera diferente y afectando a distintos genes involucrados en una misma red bioquímica.

Objetivo

Este Trabajo de Fin de Grado, que es de tipo bibliográfico y bioinformático, tiene como objetivo realizar dos redes moleculares que incorporen todas las interacciones proteína-proteína conocidas y predichas para su comparación y buscar posibles vacíos de información. Otro de los objetivos de este trabajo es que sea de apoyo en futuras investigaciones sobre cómo se comportaría la red de interacciones proteína-proteína en condiciones *sub-MIC* de diferentes antibióticos, centrándonos en una especie de gran interés clínico, como es el caso de *Escherichia coli*.

Material y Métodos

Búsqueda y selección de artículos.

Debido al carácter, en parte, bibliográfico de este trabajo, la selección de artículos ha sido fundamental. Para ello, los términos de búsquedas principales han sido “antibiotics”, “MIC”, “*Escherichia coli*”, “genes” y “Network”, haciendo uso del operador “AND” para incluir resultados que incluyeran todos los elementos de búsqueda. La búsqueda se realizó en las bases de datos de artículos científicos PubMed y Google Scholar. De los artículos encontrados, se seleccionaron solo aquellos que presentan experimentos en los que el uso de antibióticos u otros fármacos (con o sin combinación de antibióticos) inciden en la regulación génica de la resistencia frente a los mismos, afectando sus niveles MIC. El principal carácter de exclusión fue la falta de experimentos en concentraciones *sub-MIC* de fármacos específicos en *Escherichia coli* y sus efectos en la regulación génica, debido a que muchos artículos solo indicaban una subida/bajada de la MIC de la bacteria. Así se recopilaron un total de 38 artículos, los cuales tras aplicar el criterio de selección se quedaron en 18, referencias 35-53 (ver Tabla 1.). Estos 18 artículos fueron los utilizados para obtener una tabla de fármacos, concentraciones experimentales y su influencia sobre los diversos genes que regulan la resistencia frente a antibióticos.

Software y bases de datos.

A partir de dicha tabla se procedió a realizar las redes de interacción proteína-proteína, en los programas bioinformáticos CellDesigner (v. 4.4.2) y Cytoscape (v. 3.7.2). Además, para la obtención de las interacciones proteína-proteína se ha utilizado la base de datos STRING (<https://string-db.org/>).

CellDesigner es una herramienta de modelado de redes de regulación genética y bioquímica. Este programa ayuda a los usuarios a crear fácilmente dichas redes, utilizando una representación gráfica integral y sólidamente definida (*SBGN, Systems Biology Graphical Notation*), *SBGN* es un estándar en representación gráfica destinado a fomentar el eficiente almacenamiento, intercambio y utilización de información sobre vías de señalización, redes metabólicas y redes reguladoras de genes [27]. CellDesigner es compatible con *SBML (Systems Biology Markup Language)*, *SBML* es un formato de representación, basado en *XML*, para la comunicación y almacenamiento modelos

computacionales de procesos biológicos [28], y tiene un software habilitado para *Systems Biology Workbench (SBW)*, *SBW* es un software de trabajo que permite componentes de aplicaciones heterogéneos escritos en diversos lenguajes de programación y se ejecuta en diferentes plataformas que permite la comunicación entre ellas a través de un rápido sistema de mensajes codificados binarios [29], para que pueda importar/exportar documentos descritos por *SBML* e integrarse con otros paquetes de software de simulación/análisis habilitados para *SBW*. La ventaja que posee CellDesigner es un editor de diagramas de procesos con tecnología estandarizada (*SBML* en este caso) para cada plataforma informática, de modo que pueda beneficiar a la mayor cantidad de usuarios posible [30].

Por su parte, Cytoscape es un software de código abierto útil para integrar redes de interacción biomolecular con datos de expresión de alto rendimiento y otros estados moleculares en un marco conceptual unificado. Proporciona un entorno de modelado de propósito general para integrar redes y estados de interacción biomolecular [31]. Cytoscape viene provisto de una herramienta de análisis de redes, lo que permite obtener información detallada del funcionamiento, cohesión y estado de una red bioinformática.

CellDesigner se utilizó debido a que proporciona redes en formato *SBML*, por lo que los archivos son capaces de ser interpretados por la gran mayoría de programas de representación de redes biológicas. Cytoscape fue empleado debido a que posee una herramienta de análisis de redes que proporciona una serie de parámetros que, a su vez, permiten describir el funcionamiento de dicha red, estos parámetros son de gran utilidad ya que nos permiten entender cómo son las diferentes redes. Los siguientes son los parámetros más relevantes en redes no dirigidas, es decir, la dirección de la conexión es ignorada.

Análisis de redes.

El coeficiente de agrupación (*Clustering coefficient*) C_n de un nodo (este se puede definir como proteína, o gen, que participa en una red y se conecta con otros nodos) n se define como $C_n = 2e_n / (k_n(k_n - 1))$, donde k_n es el número de vecinos de n y e_n es el número de pares conectados entre todos los vecinos de n . El coeficiente de agrupación es una relación N/M , donde N es el número de conexiones entre los vecinos de n , y M es el

número máximo de conexiones que podrían existir entre los vecinos de n . El coeficiente de agrupación de un nodo siempre es un número entre 0 y 1. Los nodos con menos de 2 vecinos tienen un coeficiente de agrupación de cero [32]. El coeficiente de agrupación se puede entender como la conectividad de la red, un valor cercano a 1 implica una alta conectividad, debido a que implica que la mayoría de todas las conexiones posibles de la red existen, un valor cercano a 0 implica una baja conectividad debido a que hay muy pocas conexiones entre los nodos de entre todas las posibles.

El **diámetro de la red** (*network diameter*) es la mayor distancia entre dos nodos, si una red está descentralizada, su diámetro es el máximo de todos los diámetros de sus componentes conectados. El **radio de la red** (*network radius*), por su parte, es el mínimo entre las excentricidades distintas de cero de los nodos en la red; entendidas éstas excentricidades como la longitud máxima no infinita de una ruta más corta entre n y otro nodo en la red. Estos valores nos ayudan a identificar la distancia (número de nodos) entre dos nodos no conectados en una misma red. La **longitud media de la ruta más corta** (*average shortest path length*) proporciona la distancia esperada entre dos nodos conectados.

El **número promedio de vecinos** (*average number of neighbors*) indica la conectividad promedio de un nodo en la red. Una versión normalizada de este parámetro es la **densidad de la red** (*network density*) [33]. Indica el número medio de conexiones que posee un nodo.

Otro parámetro relacionado con la centralización es la **centralización de la red** (*network centralization*). Las redes cuyas topologías se asemejan a una estrella tienen una centralización cercana a 1, mientras que las redes descentralizadas se caracterizan por tener una centralización cercana a 0. La **heterogeneidad de la red** (*network heterogeneity*) refleja la tendencia de una red a contener nodos concentradores [33], por lo que un valor cercano a 1 implica que la red posee una cantidad elevada de nodos concentradores.

La **centralidad** (*centrality*) es un concepto para identificar nodos clave en una red, por lo que se han propuesto diferentes definiciones de centralidad. Con el término centralidad se pueden identificar nodos que son más centrales en la red y nodos en la

parte periférica [34]. Es por ello, que el nodo de centralidad se trata del nodo con el mayor número de conexiones, por lo que se trata de un nodo central en la red.

Por último, se utilizó STRING como base de datos de interacciones proteína-proteína conocidas y predichas. Las interacciones incluyen asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales); provienen de la predicción computacional, de la transferencia de conocimiento entre organismos y de interacciones agregadas de otras bases de datos (primarias) [19]. STRING se utilizó para obtener dichas interacciones proteína-proteína para su posterior representación en las redes. STRING funciona con una herramienta de búsqueda de gen/proteína, se introduce el nombre de dicho gen/proteína y se selecciona el organismo de interés, en este caso, todas las interacciones proteína-proteínas fueron recabadas a partir de *Escherichia coli* **K12 MG1655**.

Debido a que STRING proporciona dos clases de interacciones proteína-proteína, relaciones conocidas y predichas, se han realizado dos redes distintas, por lo que una red contiene exclusivamente interacciones conocidas y otra red contiene relaciones, tanto conocidas como predichas. Ya que el objetivo de este trabajo es estudiar las interacciones que inducen a la resistencia a antibióticos, realizar ambas redes nos permite comparar la información existente con la teórica, para así detectar los vacíos de información en la red de interacciones.

Resultados

A partir de la bibliografía consultada se obtuvo información que ha sido recopilada en la siguiente tabla. En la misma, se hace una relación entre las condiciones *sub-MIC* de distintos antibióticos y su efecto específico en ciertos genes.

TABLA DE CONCENTRACIÓN DE FÁRMACOS Y EFECTOS SOBRE GENES

TABLA 1. En esta tabla se representan, por un lado, los fármacos empleados, las concentraciones de fármacos utilizados en los diversos experimentos, los genes que se ven afectados por éstos y qué efectos son estos.

Fármaco	Concentración	Gen	Efectos	Referencia
Ciprofloxacino	0,015-256 µg/ml	gyrA	Glicina-78 a Aspartato	[35]

		parC	Serina-83 a Lisina	
Norfloxacin	0,2-9,7 µg/ml	gyrB	Aspartato-142 a Asparagina. Lisina-149 a Glutamato	[36]
		parE	Leucina-148 a Histidina	
Omeprazol	100 µg/ml	acrA	Sobreexpresión	[37]
		acrB	Sobreexpresión	
		tolC	Sobreexpresión	
		acrR	Arginina-45 a Cisteína	
Amikacina	0,016 mg/ml	aac(6')-Ib	Mayor prevalencia	[38]
		aac(3)-IIa	Mayor prevalencia	
		aph(3')-Ia	Mayor prevalencia	
		ant(2.)-Ia	Mayor prevalencia	
Ácido gálico	0,25 mg/ml	pgaA	Inhibición	[39]
		pgaB	Inhibición	
		pgaC	Inhibición	
		pgaD	Sobreexpresión	
Ciprofloxacino	0,39-25 µg/ml	parC	Mutación con cambio de sentido en Glicina-78, Serina-80 y Glutamina-84	[40]
Levofloxacino	0,78-25 µg/ml			
Ácido Nalidíxico	50- >200 µg/ml			
Esparfloxacino	0,39-12,5 µg/ml			
Telurito de potasio	0,001-0,8 mg/ml	terD	Mayor prevalencia	[41]
Ácido peptidonucleico	0,25-128 µg/ml	mcr-1	Inhibición	[42]
Azitromicina	0,256-1,024 mg/ml	mph(A)	Gen llegado desde <i>Shigella sonnei</i> por transferencia horizontal	[43]
Ciprofloxacino	0,007 -128 µg/ml	gyrA	Serina-83 a Leucina y Aspartato-87 a Tirosina o Asparagina	[44]
Ácido Nalidíxico	2-2000 µg/ml	gyrB	Lisina-447 a Glutamato	
Tetraciclina	0,0015-0,01 mg/ml	acrA	Sobreexpresión	[45]
		acrB	Sobreexpresión	

		tolC	Sobreexpresión	
		soxS	Sobreexpresión	
		rob	Sobreexpresión	
		ompA	Sobreexpresión	
		ompX	Sobreexpresión	
		ompF	Inhibición	
		ompC	Inhibición	
		micF	Sobreexpresión	
		marA	Sobreexpresión	
Ciprofloxacino	2–64 µg/ml	qnrA	Promover la transferencia horizontal de genes	[46]
		qnrB	Promover la transferencia horizontal de genes	
Ofloxacino	8–64 µg/ml	aac(6')-Ib	Promover la transferencia horizontal de genes	
		qepA	Promover la transferencia horizontal de genes	
Ácido Nalidíxico	8–64 µg/ml	oqxA	Promover la transferencia horizontal de genes	
		oqxB	Promover la transferencia horizontal de genes	
Doxiciclina	0,375-192 µg/ml	RS17215	Sobreexpresión. Valina-58 a Isoleucina	[47]
		RS17640	Sobreexpresión. Prolina-248 a Leucina	
		RS08025	Sobreexpresión. Glicina-55 a Ácido aspártico	
Ceftazidima	0,0625-256 µg /ml	ibpA	Inhibición	[48]
		ibpB	Inhibición	
		tnaA	Sobreexpresión	
Quercetina	1-256 µg/ml	tetA	Inhibición	[49]
		tetB	Inhibición	
		tetM	Inhibición	
		tetS	Inhibición	
Piperacilina/tazobactam	0,032-0,256 mg/ml	TEM-1	Inhibición	[50]
		TEM-30	Inhibición	

		TEM-35	Inhibición	
		TEM-40	Inhibición	
		TEM-135	Inhibición	
Fosfomicina	50 µg/ml	uhpT	Inhibición	[51]
		uhpA	Mutación de cambio de sentido. Aminoácido pasa de 591pb a 283pb	
Norfloxacino	0,094-256 µg/ml	gyrA	Serina-83 a Leucina, Aspartato-87 a Glicina y Alanina-196 a Glutamato	[52]
		parC	4 mutaciones	
Ciprofloxacino	0,012-32 µg/ml	parE	4 mutaciones	
Ácido Nalidíxico	1-256 µg/ml	marR	1 mutación sin sentido y 2 mutaciones por desplazamiento del marco de lectura	
		acrR	2 mutaciones por desplazamiento del marco de lectura y 1 duplicación	
Fluoxetina	0,0005-1 mg/ml	marR	Inserción, Delección y Sustitución	[53]
		rob	Fenilalanina-163 a Cisteína	
		sdiA	Asparagina-217 a Serina	
		cytR	Glutamina-267, CAG→TAG	
		crp	Valina-109 a Glicina	
		acrB	Inhibición	
		acrD	Inhibición	
		ompF	Inhibición	
		ompW	Inhibición	
		yadG	Sobreexpresión	
		yadH	Sobreexpresión	

		acrA	Sobreexpresión	
		acrB	Sobreexpresión	
		tolC	Sobreexpresión	
		tsx	Sobreexpresión	
		mdlA	Sobreexpresión	
		mdlB	Sobreexpresión	
		mdfA	Sobreexpresión	
		emrB	Sobreexpresión	
		yciK	Sobreexpresión	
		ampC	Sobreexpresión	
		ampH	Sobreexpresión	
		mrcA	Sobreexpresión	
		mrdA	Sobreexpresión	
		dacA	Sobreexpresión	
		insB	Inhibición	
		insF	Inhibición	
		yfmD	Inhibición	
		yfjH	Inhibición	
		udp	Sobreexpresión	
		cdd	Sobreexpresión	
		tsx	Sobreexpresión	
		mdtF	Sobreexpresión	
		oppA	Inserción (+G)	
		sodA	Sobreexpresión	
		gor	Sobreexpresión	
		ahpF	Sobreexpresión	
		trxB	Sobreexpresión	
		soxR	Aspartato-137 a Tirosina	
		perR	Leucina-168 CTG→CTT	

Con estos datos se realizaron dos redes distintas, una donde se representan interacciones proteína-proteína conocidas, y otra donde se representan interacciones predichas. Las interacciones proteína-proteína conocidas provienen de evidencias de interacción experimental, por lo que se tratan de interacciones de existencia confirmada. Las interacciones predichas tienen como origen un pronóstico computacional empleando diversos algoritmos [19]. Una vez representadas dichas interacciones en las redes, en la primera, la red de interacciones conocidas se pueden observar 5 subredes independientes entre ellas (ver red de interacciones conocidas) que son: la tolC, la dacA-mrcA, la ahpC, la rpoB y la cdd. En cambio, en la segunda, es decir en la red de interacciones predichas destacan tres subredes (ver red interacciones predichas), la tolC, la dacA-mrcA y uhpA; tanto tolC como dacA-mrcA son de mayor

tamaño que sus contrapartes en la red de interacciones conocidas. Las redes de interacciones proteína-proteína se pueden dividir en redes de menor tamaño dentro de las mismas, es decir, subredes y para identificarlas se emplean principalmente tres factores: por un lado, las subredes deben ser independientes entre sí, esto es, que no hayan conexiones entre ellas; otro factor es que el número de nodos (estos son las proteínas (genes)) sea mayor de 10 y que al menos uno de estos nodos se vea afectado directamente por un antibiótico según la bibliografía.

Las redes se pueden consultar en GitHub, donde se ha publicado un repositorio de carácter público en el que se encuentran las redes, ambas están publicadas en dos formatos distintos, por un lado, *SBML* de CellDesigner, y por el otro, en formato Cytoscape. Además de estos archivos, y debido al carácter público del repositorio, se ha adjuntado un documento en formato PDF que tiene como función explicar brevemente qué son dichos archivos; este documento se encuentra escrito tanto en Español como en Inglés. Para descargar todos los documentos, seleccione el recuadro verde con el texto “Code” y elija “Download ZIP”, así se descargará todos los documentos de una sola vez. La dirección del repositorio es: <https://github.com/SantiagoOrtegaFerris/Red-de-resistencia-a-antibi-ticos-en-Escherichia-Coli---TFG>

Redes de interacciones conocidas y su descripción

TABLA DE RED Y SUBREDES DE INTERACCIONES CONOCIDAS:

TABLA 2. En esta tabla se representan los valores asociados con la red de interacciones conocidas y sus subredes.

	Red de interacciones conocidas	Subredes				
		tolC	dacA- mrcA	ahpC	rpoB	cdd
Nodo de centralidad (número de conexiones)	tolC (21)	tolC (21)	dacA y mrcA (14)	ahpC (11)	rpoB (13)	Cdd (11)
Coefficiente de agrupación	0,497	0,651	0,658	0,803	0,427	0,713
Diámetro de la red	9	9	3	4	7	3
Radio de la red	1	5	2	2	4	2

Longitud media de la ruta más corta	2,91	3,097	1,684	2,464	0,427	1,385
Número medio de vecinos	4,392	6,5	7,7	5,111	4,25	7,538
Centralización de la red	0,069	0,296	0,368	0,245	0,194	0,341
Heterogeneidad de la red	0,971	0,653	0,513	0,512	0,745	0,359

La red de interacciones conocidas está conformada por un total de 245 nodos, el nodo de centralidad de esta red es tolC ya que es el nodo que tiene el mayor número de conexiones con un total de 21 conexiones. El coeficiente de agrupación es 0,497 lo que indica que la conectividad de la red es media, con aproximadamente la mitad de todas las conexiones posibles. El diámetro de la red es de 9 mientras que el radio de la red es 1. La longitud media de la ruta más corta es 2,91. Por su parte, el número medio de vecinos es de 4,392. El valor de centralización de la red es 0,069, lo que indica que la red se encuentra muy descentralizada, así mismo, el valor de la heterogeneidad de la red es 0,971, lo que sugiere la importancia de la presencia de nodos concentradores.

Subred tolC

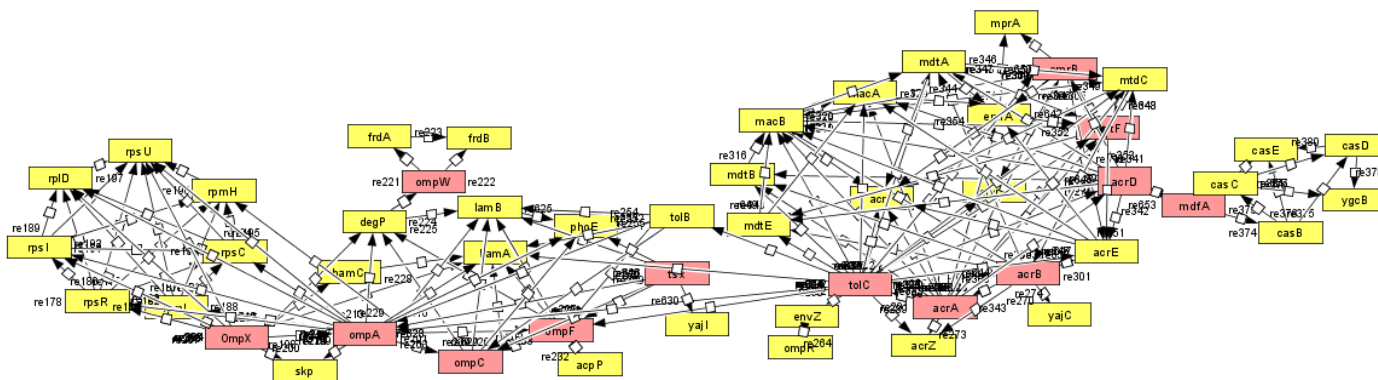


Figura 1. Subred tolC

Esta subred está formada por 52 nodos, 12 de ellos pertenecen a los bibliográficos (ompX, ompA, ompC, ompF, ompW, tolC, acrA, acrB, acrD, emrB, mdtF y mdfA), de todos ellos el nodo de centralidad es tolC, ya tiene 21 conexiones con otras proteínas. Esta subred posee un coeficiente de agrupación de 0,651, lo que indica una conectividad media-alta de la subred. El diámetro de la subred es de 9 mientras que el radio de la

subred es 5, esto sugiere que hay una distancia máxima alta entre los nodos más lejanos. La longitud media de la ruta más corta es 3,097, que es la distancia que se espera entre nodos no conectados directamente en la subred. El número promedio de vecinos es de 6,5. El valor de centralización de la subred es de 0,296 lo que muestra que se trata de una subred descentralizada, por otro lado, el valor de la heterogeneidad de la subred es 0,653, esto indica la presencia media de nodos concentradores.

Subred dacA-mrcA

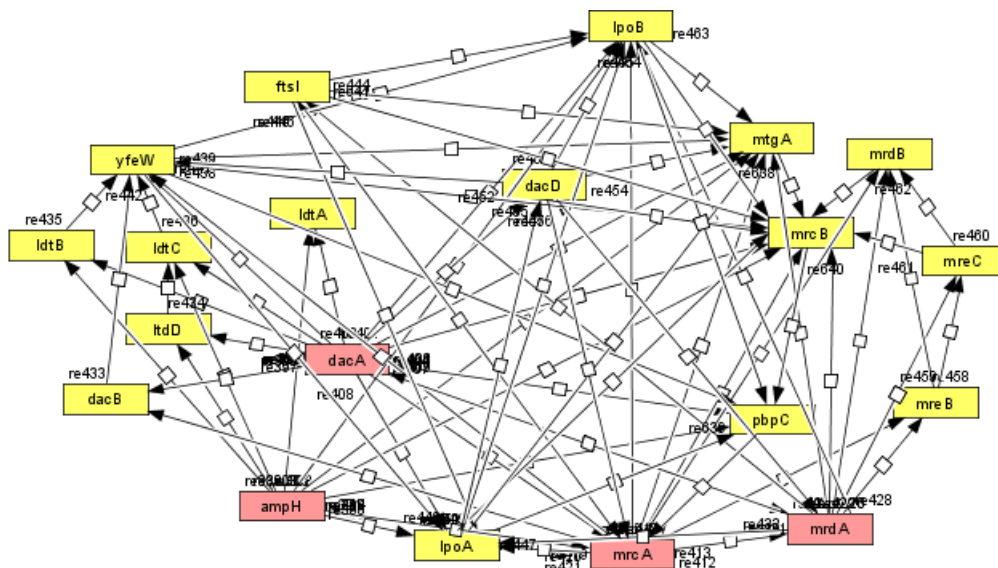


Figura 2. Subred dacA-mrcA

Esta subred consta de 20 nodos, de todos estos, 4 fueron recogidos en la bibliografía (ampH, dacA, mrcA y mrdA), donde los nodos de centralidad son, tanto dacA como mrcA, ya que ambos presentan 14 conexiones con otras proteínas. El coeficiente de agrupación de esta subred es 0,658, esto sugiere una conectividad media-alta de la subred. El diámetro de la subred es de 3, mientras que el radio de la subred es 2, por lo que los nodos no conectados entre ellos se encuentran relativamente cerca. En cuanto a la longitud media de la ruta más corta, este es 1,684. El número promedio de vecinos es de 7,7. Por otro lado, el valor de centralización de la subred es de 0,368, esto indica una centralización baja de la subred, mientras que el valor de la heterogeneidad de la subred es 0,513 denota la existencia de ciertos nodos concentradores.

Subred ahpC

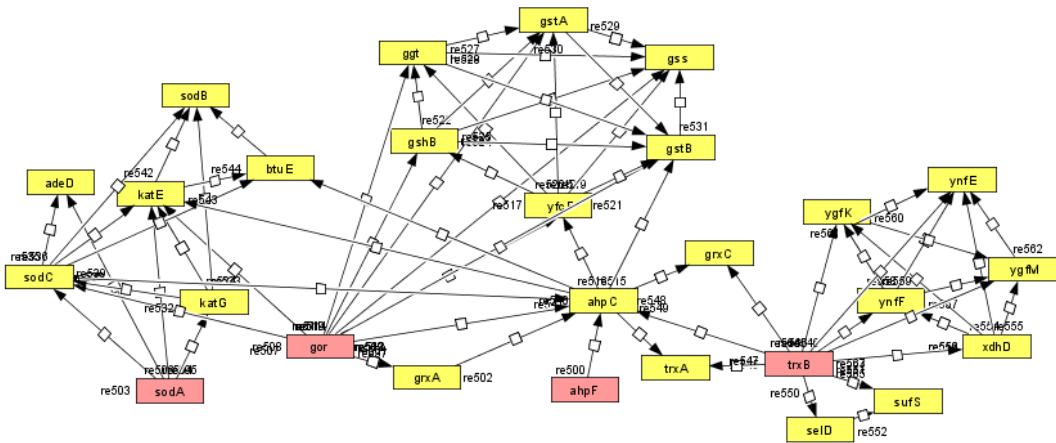


Figura 3. Subred ahpC

Esta subred se encuentra formada por 27 nodos, de estos, 4 fueron recopilados a partir de la bibliografía (sodA, gor, ahpF y trxB). ahpC es el nodo de centralidad de la subred, ya que posee 21 conexiones con otras proteínas. En cuanto al coeficiente de agrupación de la subred, tiene un valor de 0,803, esto sugiere que la conectividad de la subred es alta. Con respecto al diámetro de la subred, este tiene un valor de 4, mientras que el radio de la subred tiene un valor de 2, por lo que las distancias máximas entre nodos no conectados son relativamente altas. La longitud media de la ruta más corta es 2,464. Con respecto al número promedio de vecino, el valor es 5,111. Con respecto al valor de centralización de la subred es de 0,245, por lo que se trata de una subred descentralizada, por su parte, el valor de la heterogeneidad de la subred es 0,512, indica la presencia media de nodos concentradores.

Subred rpoB

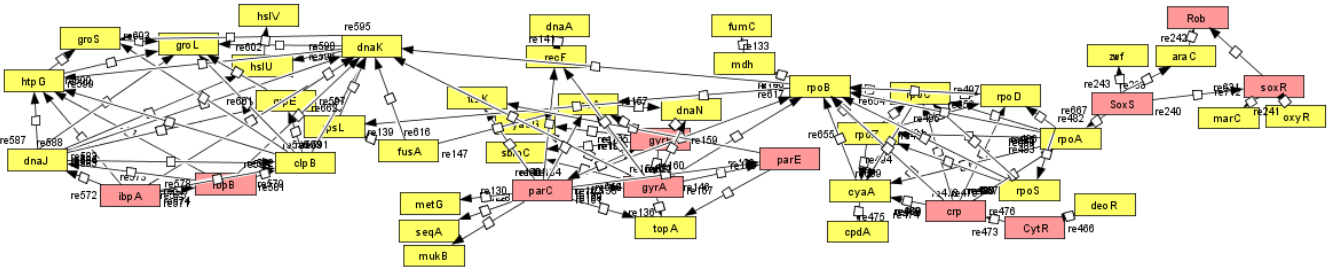


Figura 4. Subred rpoB

Esta subred está formada por 48 nodos, de los cuales 11 pertenecen a los bibliográficos (ibpA, ibpB, parC, gyrA, gyrB, parE, soxS, soxR, rob, crp y cytR), el nodo de centralidad es rpoB, con un total de 13 conexiones. El coeficiente de agrupación de la subred equivale a 0,427, por lo que se trata de una subred con una conectividad baja. El diámetro de la subred es de 7 mientras que el radio de la subred es 4, por lo que las distancias máximas entre nodos no conectados son altas. Por su parte, la longitud media de la ruta más corta es 3,297. El número promedio de vecinos es de 4,25. Por otro lado, el valor de centralización de la subred es de 0,194 este valor sugiere que esta subred es altamente descentralizada, mientras que el valor de la heterogeneidad de la subred es 0,745, por los nodos concentradores son de alta importancia en esta subred.

Subred cdd

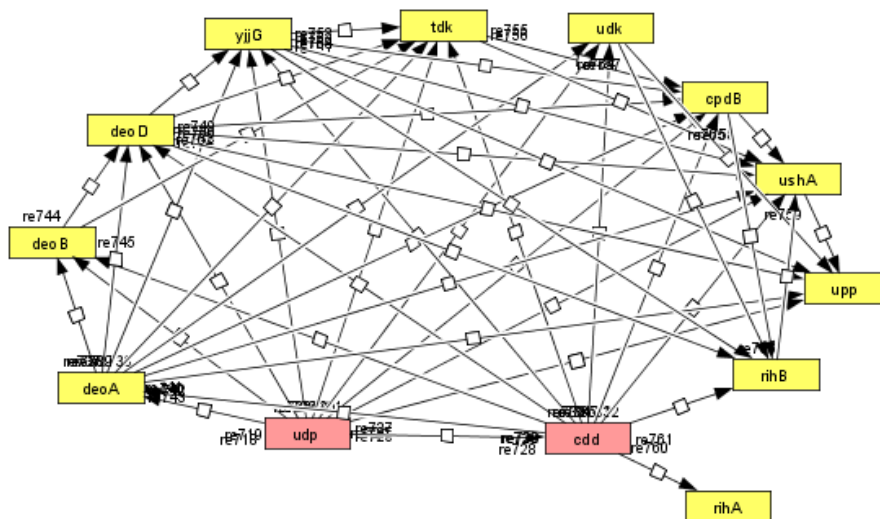


Figura 5. Subred cdd

Esta subred está formada por 13 nodos, solo 2 de ellos fueron recopilados en la bibliografía (cdd y udp), el nodo de centralidad de la subred es cdd con un total de 11 conexiones. Esta subred tiene un coeficiente de agrupación de valor 0,713, por lo que gran parte de las conexiones posibles de la res están presentes. El diámetro de la subred es de 3, mientras que el radio de la subred es 2, por lo que se trata de una subred con los nodos muy cercanos entre ellos. La longitud media de la ruta más corta es 1,385 y el número promedio de vecinos es 7,538. El valor de centralización de la subred es 0,341, por lo que es una subred descentralizada, así mismo, el valor de la heterogeneidad de la

subred es 0,359, por lo que los nodos centralizadores no tienen una gran importancia en la subred.

Redes de interacciones predichas y su descripción

TABLA DE RED Y SUBREDES DE INTERACCIONES PREDICHAS:

TABLA 3. En esta tabla se representan los valores asociados con la red de interacciones predichas y sus subredes.

	Red de interacciones predichas	Subredes		
		tolC	dacA-mrcA	uhpA
Nodo de centralidad (número de conexiones)	tolC (27)	tolC (27)	dacA, mrcA y yfew (14)	uhpA (9)
Coefficiente de agrupación	0,576	0,628	0,569	0,629
Diámetro de la red	15	15	6	4
Radio de la red	1	1	3	2
Longitud media de la ruta más corta	6,326	6,438	2,32	1,956
Número medio de vecinos	5,075	5,706	6,759	4
Centralización de la red	0,073	0,102	0,278	0,449
Heterogeneidad de la red	0,797	0,698	0,624	0,612

Esta red la forman 305 nodos, de los cuales destaca tolC como el nodo de centralidad con un total de 27 conexiones. El coeficiente de agrupación de la red es 0,576, lo que sugiere que la conectividad de la red es media, con más de la mitad de todas las conexiones posibles presentes. El diámetro de la red es de 15 mientras que el radio de la red es 1. La longitud media de la ruta más corta es 6,326. En cuanto al número promedio de vecino, el valor es 5,075. El valor de centralización de la red es 0,073, por lo que se trata de una red muy descentralizada, así mismo, el valor de la heterogeneidad de la red es 0,797, por lo que los nodos concentradores tienen una gran importancia en esta red.

Subred tolC

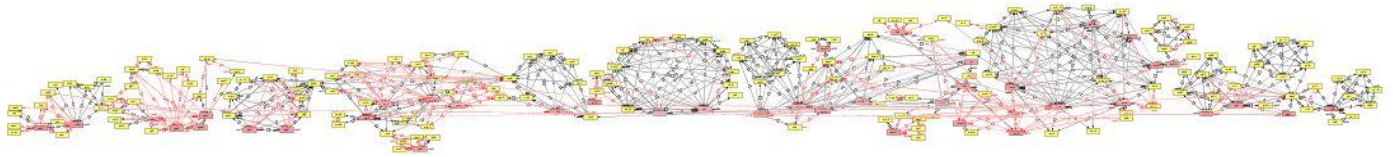


Figura 6. Subred tolC

Esta subred está conformada por 211 nodos, de todos estos, 41 fueron recogidos en la bibliografía (yadG, yadH, pgaA, pgaB, pgaC, pgaD, ibpA, ibpB, parC, gyrA, gyrB, parE, soxS, soxR, rob, crp y cytR, yciK, udp, cdd, ompX, ompA, ompC, ompF, ompW, tsx, marA, marR, tolC, acrA, acrB, acrD, emrB, mdtF, mdFA, perR, sodA, gor, ahpF, trxB). El nodo de centralidad es tolC, con un total de 27 conexiones. El coeficiente de agrupación de esta subred es de 0,628, por lo que se trata de una subred con una conectividad alta. El diámetro de la subred es de 15, mientras que el radio es 1, por lo que la distancia máxima entre nodos no conectados es alta, el hecho de que la diferencia entre el valor del diámetro sea tan alta indica que se trata de una subred de gran tamaño. En cuanto a la longitud media de la ruta más corta, este es 6,438. En cuanto al número promedio de vecinos, este es de 5,706. El valor de centralización de la subred es de 0,102, por lo que se trata de una subred muy descentralizada, por otro lado, el valor de la heterogeneidad de la subred es 0,698, lo que demuestra una elevada importancia de los nodos concentradores.

Subred dacA-mrcA

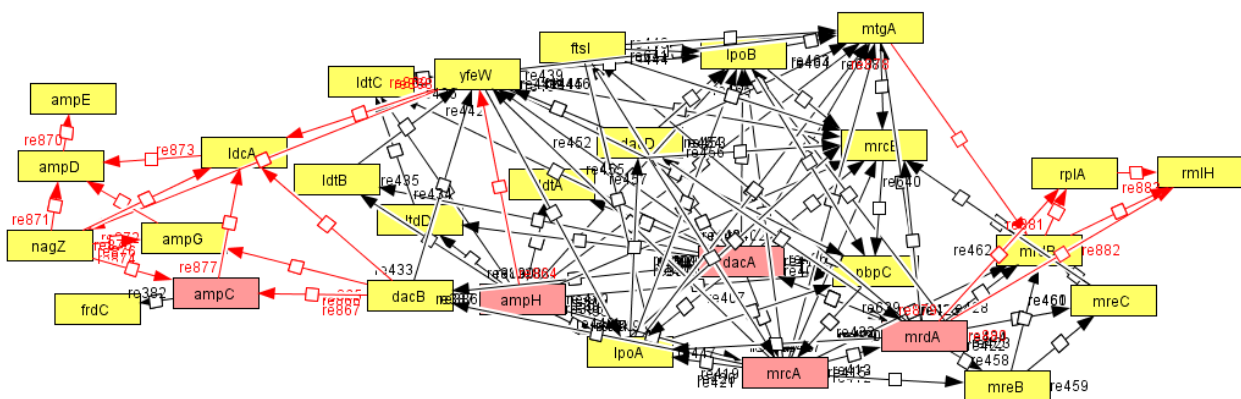


Figura 7. Subred dacA-mrcA

Esta subred consta de 29 nodos, de los cuales 5 fueron recogidos en la bibliografía (ampC, ampH, dacA, mrcA y mrdA), los nodos de centralidad de esta subred son yfew, dacA y mrcA ya que todos poseen el mismo número de conexiones, 14. El coeficiente de agrupación de esta subred es 0,569, por lo que tiene un nivel de conectividad mediano. El diámetro de la subred es de 6, mientras que el radio de la subred es 3, lo que denota una distancia máxima entre nodos no conectados media-alta. En cuanto a la longitud media de la ruta más corta, este es 2,32. El número promedio de vecinos es de 6,759. Por otro lado, el valor de centralización de la subred es de 0,278, lo que indica que se trata de una subred descentralizada, mientras que el valor de la heterogeneidad de la subred es 0,624, lo que sugiere que los nodos concentradores tienen una importancia media-alta.

Subred uhpA

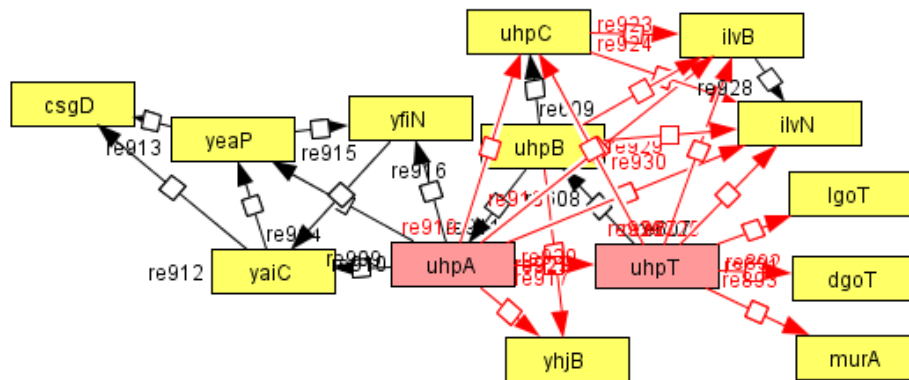


Figura 8. Subred uhpA

Esta subred consta de 14 nodos, entre ellos, uhpA es el nodo de centralidad con 9 conexiones. El coeficiente de agrupación de la subred es 0,629, por lo que se trata de una subred con una conectividad media-alta. El diámetro de la subred es de 4 mientras que el radio de la subred es 2, por lo que las distancias máximas entre nodos no conectados son bajas. La longitud media de la ruta más corta es 1,956 y el número promedio de vecinos es 4. El valor de centralización de la subred es 0,449, por lo que se trata de una red con una centralización media-baja. Por último, el valor de la heterogeneidad de la subred es 0,612, lo que indica una importancia media-alta de los nodos concentradores.

Discusión

Estas redes por lo general presentan una conectividad media-alta, ya que, todas las redes, menos en 2 (tolC y rpoB, ambas subredes de interacciones conocidas), el coeficiente de agrupación es mayor de 0,5; en esto destacan las redes de interacciones predichas, cuyos valores son mayores que 0,5, lo cual se debe a un mayor número tanto de nodos como de conexiones, por lo que un aspecto a investigar sería comprobar si realmente existen estas interacciones proteína-proteína. El hecho de que al añadir conexiones predichas no baje la conectividad total de las redes sugiere que no son aportaciones marginales y podrían encontrarse realmente en la red molecular. Otro valor destacable es el de centralización, ya que en todas las redes y subredes el valor es menor a 0,5 (el valor más alto es 0,449), por lo que todas las redes presentan una alta descentralización, lo indica que los nodos se encuentran aislados entre sí, estos valores son anormales, debido a que en redes “adecuadas” (redes con alta conectividad, densidad de nodos y centralización) , tanto los valores de agrupamiento como los valores de centralización son altos [33]. El hecho de que estos valores sean tan bajos puede deberse a la falta de conocimiento de los mecanismos de regulación antimicrobiana y la escasa información experimental de interacciones proteína-proteína en la resistencia frente a antibióticos. Esto nos puede sugerir el hecho de que se desconozcan genes que intervienen en la regulación frente a los antibióticos, o que estos genes estén identificados, pero no se sepa con total exactitud cómo se relacionan con el resto de los genes. También puede deberse a que no se sepa qué efectos pueden tener sobre todos los antibióticos disponibles. Además, en estas redes y subredes destaca el valor de la heterogeneidad, ya que siempre presenta valores superiores a 0,5, exceptuado un caso, con una media de 0,589. Esto destaca la importancia de los nodos centrales, que son nodos claves en la regulación génica, por lo que investigar en mayor detalle los efectos de las condiciones *sub-MIC* de los antibióticos en ellos es fundamental para comprender los mecanismos frente a la resistencia antimicrobiana; ejemplo de ello es el gen tolC (*Outer membrane protein TolC*), ya que actúa como canal en el transporte de moléculas a través de la membrana externa y en la salida de muchas moléculas como antibióticos; además, tiene un papel clave en la adhesión y la formación de biopelículas en EAEC (*Enteroadgregative Escherichia coli*) [54].

Estos resultados nos muestran el hecho de que existe una falta de conocimientos sobre interacciones proteína-proteína, pues en la red de interacciones conocidas se puede observar la existencia de varias subredes que, en un principio, parecen ser independientes entre sí, pero en la red de interacciones predichas se unen para formar una gran subred, y el conocer hasta qué punto estas subredes están realmente conectadas es de vital importancia para poder comprender realmente los mecanismos frente a la resistencia a antibióticos. Genes como *tolC*, *ompA*, *dacA*, *mrcA* y *parC*, que son genes con una alta conectividad y suelen ser genes centrales en sus respectivas subredes, se ven influenciados por antibióticos en condiciones *sub-MIC* y estos se incorporan en redes de interacción proteína-proteína, por lo que conocer de qué manera son afectados y cómo se relacionan con otras proteínas es fundamental. Un gen que destaca por su alta conectividad, pero en la bibliografía no se ha comprobado que sea directamente influenciado por ningún antibiótico, es *ahpC* (*Alkyl hydroperoxide reductase C*). Este gen es el nodo de centralidad en su respectiva subred, se trata de una peroxidasa específica de tiol que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos a agua y alcoholes, jugando un papel en la protección celular contra el estrés oxidativo al desintoxicar los peróxidos [55].

Entre los antibióticos más afectados por el aumento de la resistencia a ellos, están las fluoroquinolonas (ciprofloxacino, ácido nalidíxico, levofloxacino, ofloxacino, etc.), los cuales son de los antibióticos más empleados en la medicina moderna. Ejemplo de la importancia de estudiar los mecanismos de acción de resistencia es, por ejemplo, en el caso de que un único antibiótico en condiciones *sub-MIC* (por ejemplo ciprofloxacino) es capaz de inducir resistencia no solo frente a ciprofloxacino, sino a una variedad de antibióticos los cuales no habían sido expuestos contra la bacteria, lo que indica que la múltiple respuesta a antibióticos puede ser inducida por un único antibiótico que inhabilite a los demás [56]. Es por ello que investigar los efectos de cada antibiótico sobre la respuesta de los demás es un tema de investigación muy importante para la medicina.

También se ha observado la necesidad de monitorizar fármacos que, de manera tradicional, no se han empleado como antibióticos. Ejemplo de ello es el tratamiento con omeprazol que en combinación con antibióticos redujo la *MIC* de casi todos los

antibióticos entre 2-8 veces, por ejemplo, en ausencia de omeprazol, la *MIC* de la ciprofloxacina es 4-8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, pero en presencia de omeprazol la *MIC* es 0,5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; en tal sentido, el omeprazol en combinación con otros antibióticos, tienen un efectos positivo al reducir la *MIC* frente a antibióticos, por lo que estos serán más efectivos contra las bacterias [35]. El caso contrario es el de fluoxetina, ya que se han comprobado que es capaz de aumentar los niveles de *MIC* de tetraciclinas que se incrementó hasta unas 4 veces y el caso de levofloxacino y norfloxacino aumentó hasta una 16 veces [53]. Estos estudios indican que es importante investigar si algunos fármacos de uso común puedan tener efectos sobre la resistencia a antibióticos, lo cual es de vital importancia debido al gran uso de medicamentos, que pueden acabar afectando a bacterias de gran importancia clínica.

Conclusiones:

Tras la realización de las redes, ha quedado evidenciada la falta de información acerca de las interacciones proteína-proteína reguladoras de los procesos de resistencia frente a antibióticos, resultado de esta falta de información son los valores de centralización de las redes y de todas las subredes. Este trabajo muestra la importancia de los nodos centrales de las redes/subredes, que son los genes centrales de las redes de regulación de resistencia, por lo que el estudio de estos genes es fundamental para la comprensión de estos fenómenos de resistencia. El gen *ahpC* es de gran interés, ya que es el gen de centralidad en su subred y no se dispone bibliografía de cómo se ve afectado por condiciones *sub-MIC* de antibióticos. Por último, destacamos la importancia de estudiar los efectos de diversos fármacos que no han sido utilizados tradicionalmente como antibióticos, por sus posibles efectos tanto negativos como positivos en la regulación de la resistencia a los antibióticos.

Conclusions

After the realization of the networks, the lack of information about the protein-protein interactions regulating the processes of resistance to antibiotics has been evidenced, result of this lack of information are the centralization values of the networks and of all the subnetworks. This work shows the importance of the central nodes of the networks/subnetworks, which are the central genes of the resistance regulation

networks, so the study of these genes is fundamental for the understanding of these resistance phenomena. The *ahpC* gene is of great interest, since it is the centrality gene in its subnetwork and there is no bibliography on how it is affected by sub-MIC conditions of antibiotics. Finally, we highlight the importance of studying the effects of various drugs that have not been traditionally used as antibiotics, due to their possible negative and positive effects on the regulation of antibiotic resistance that they might have.

Referencias:

1. Andersson DI, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(7):465-478. doi:10.1038/nrmicro3270
2. Lynch JP 3rd, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum β -lactamases and carbapenemases). *Expert Opin Pharmacother.* 2013;14(2):199-210. doi:10.1517/14656566.2013.763030
3. Carlet J, Jarlier V, Harbarth S, et al. Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2012;1(1):11. Published 2012 Feb 14. doi:10.1186/2047-2994-1-11
4. WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
5. Lynch JB. Multidrug-resistant Tuberculosis. *Med Clin North Am.* 2013;97(4):553-x. doi:10.1016/j.mcna.2013.03.012
6. Jiang L, Hu X, Xu T, Zhang H, Sheng D, Yin D. Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *Sci Total Environ.* 2013;458-460:267-272. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.038
7. Fram MS, Belitz K. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. *Sci Total Environ.* 2011;409(18):3409-3417. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.05.053
8. Rice LB. The complex dynamics of antimicrobial activity in the human gastrointestinal tract. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2013;124:123-132.
9. Gustafsson I, Sjölund M, Torell E, et al. Bacteria with increased mutation frequency and antibiotic resistance are enriched in the commensal flora of patients with high antibiotic usage. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(4):645-650. doi:10.1093/jac/dkg427
10. Lorian V. Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. *Bull N Y Acad Med.* 1975;51(9):1046-1055.
11. Lorian V, Atkinson B. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on cross walls of cocci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976;9(6):1043-1055. doi:10.1128/aac.9.6.1043
12. Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere.* 2009;75(4):417-434. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.086
13. Sören, Thiele-Bruhn. (2003). Pharmaceutical Antibiotic Compounds in Soils – A Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science.* 166. 145 - 167. 10.1002/jpln.200390023.
14. Andersson, D. I., Hughes, D. & Roth, J. R. in *EcoSal — Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* ch. 5.6.6 (eds Böck, A., et al.) (ASM Press, 2011).
15. Hooper DC, Wolfson JS, Ng EY, Swartz MN. Mechanisms of action of and resistance to ciprofloxacin. *Am J Med.* 1987;82(4A):12-20.
16. Davies J. General mechanisms of antimicrobial resistance. *Rev Infect Dis.* 1979;1(1):23-29. doi:10.1093/clinids/1.1.23
17. Hughes D, Andersson DI. Selection of resistance at lethal and non-lethal antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol.* 2012;15(5):555-560. doi:10.1016/j.mib.2012.07.005
18. Karine de Sousa A, Rocha JE, Gonçalves de Souza T, et al. New roles of fluoxetine in pharmacology: Antibacterial effect and modulation of antibiotic activity. *Microb Pathog.* 2018;123:368-371. doi:10.1016/j.micpath.2018.07.040

19. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D607-D613. doi:10.1093/nar/gky1131
20. De Las Rivas J, Fontanillo C. Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks. *PLoS Comput Biol.* 2010;6(6):e1000807. Published 2010 Jun 24. doi:10.1371/journal.pcbi.1000807
21. BRANDES, ULRIC & ROBINS, GARRY & McCranie, Ann & Wasserman, Stan. (2013). What is network science?. *Network Science.* 1. 10.1017/nws.2013.2.
22. Maniatis T, Reed R. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature.* 2002;416(6880):499-506. doi:10.1038/416499a
23. Barabási, A., Oltvai, Z. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* 5, 101–113 (2004). <https://doi.org/10.1038/nrg1272>
24. Gosak M, et al. Network Science of Biological Systems at Different Scales: A Review. *Phys Life Rev* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.pprev.2017.11.003>.
25. Dunne JA, Williams RJ, Martinez ND. Food-web structure and network theory: The role of connectance and size. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(20):12917-12922. doi:10.1073/pnas.192407699
26. Wentker P, Eberhardt M, Dreyer FS, et al. An Interactive Macrophage Signal Transduction Map Facilitates Comparative Analyses of High-Throughput Data. *J Immunol.* 2017;198(5):2191-2201. doi:10.4049/jimmunol.1502513
27. Le Novère N, Hucka M, Mi H, et al. The Systems Biology Graphical Notation [published correction appears in *Nat Biotechnol.* 2009 Sep;27(9):864]. *Nat Biotechnol.* 2009;27(8):735-741. doi:10.1038/nbt.1558
28. Encyclopedia of Systems Biology Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Yokota, H., Cho, K.-H. (Eds.) SBML, pp2057-2062 Springer 2013 ISBN 978-1-4419-9863-7
29. Frank T. and Sauro H., 2012. SBW - The Systems Biology Workbench. [online] [Sbw.sourceforge.net](http://sbw.sourceforge.net). Available at: <<http://sbw.sourceforge.net/>> [Accessed 18 August 2020].
30. Funahashi A., Morohashi M., Matsuoka Y., Jouraku A., Kitano H. (2007) CellDesigner: A Graphical Biological Network Editor and Workbench Interfacing Simulator. In: Choi S. (eds) Introduction to Systems Biology. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-531-2_21
31. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-2504. doi:10.1101/gr.1239303
32. Watts DJ, Strogatz SH. Collective dynamics of 'small-world' networks. *Nature.* 1998;393(6684):440-442. doi:10.1038/30918
33. Dong J, Horvath S. Understanding network concepts in modules. *BMC Syst Biol.* 2007;1:24. Published 2007 Jun 4. doi:10.1186/1752-0509-1-24
34. M. R. da Silva, H. Ma and A. Zeng, "Centrality, Network Capacity, and Modularity as Parameters to Analyze the Core-Periphery Structure in Metabolic Networks", in Proceedings of the IEEE, vol. 96, no. 8, pp. 1411-1420, Aug. 2008, doi: 10.1109/JPROC.2008.925418.
35. Heisig P. Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1996;40(4):879–885. doi: 10.1128/AAC.40.4.879.
36. Breines DM, Ouabdesselam S, NG EY, Tankovic J, Shah S, Soussy CJ, Hooper DC. Quinolone resistance locus nfxD of *Escherichia coli* is a mutant allele of the parE gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:175–179.
37. Chowdhury N, Suhani S, Purkaystha A, et al. Identification of *AcrAB-ToIC* Efflux Pump Genes and Detection of Mutation in Efflux Repressor *AcrR* from Omeprazole Responsive Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates Causing Urinary Tract Infections. *Microbiol Insights.* 2019;12:1178636119889629. Published 2019 Dec 4. doi:10.1177/1178636119889629
38. Cirit OS, Fernández-Martínez M, Yayla B, Martínez-Martínez L. Aminoglycoside resistance determinants in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Turkish and Syrian patients. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2019;66(3):327-335. doi:10.1556/030.66.2019.005

39. Kang J, Li Q, Liu L, Jin W, Wang J, Sun Y. The specific effect of gallic acid on *Escherichia coli* biofilm formation by regulating *pgaABCD* genes expression. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(4):1837-1846. doi:10.1007/s00253-017-8709-3
40. Kumagai Y, Kato JI, Hoshino K, Akasaka T, Sato K, Ikeda H. Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(3):710-714. doi:10.1128/AAC.40.3.710
41. Lewis GL, Jorgensen QR, Loy JD, Moxley RA. Tellurite Resistance in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*. 2018;75(6):752-759. doi:10.1007/s00284-018-1444-x
42. Nezhadi J, Narenji H, Soroush Barhaghi MH, et al. Peptide nucleic acid-mediated re-sensitization of colistin resistance *Escherichia coli* KP81 harboring *mcr-1* plasmid. *Microb Pathog*. 2019;135:103646. doi:10.1016/j.micpath.2019.103646
43. Phuc Nguyen MC, Woerther PL, Bouvet M, Andremont A, Leclercq R, Canu A. *Escherichia coli* as reservoir for macrolide resistance genes. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(10):1648-1650. doi:10.3201/eid1510.090696
44. Vila J, Ruiz J, Marco F, et al. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(10):2477-2479. doi:10.1128/aac.38.10.2477
45. Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, et al. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One*. 2007;2(4):e365. Published 2007 Apr 11. doi:10.1371/journal.pone.0000365
46. Wu B, Qi Q, Zhang X, et al. Dissemination of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes from swine farms to surroundings. *Sci Total Environ*. 2019;665:33-40. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.01.272
47. Yang Y, Mi J, Liang J, et al. Changes in the Carbon Metabolism of *Escherichia coli* During the Evolution of Doxycycline Resistance. *Front Microbiol*. 2019;10:2506. Published 2019 Nov 1. doi:10.3389/fmicb.2019.02506
48. Sun F, Yuan Q, Wang Y, et al. Sub-minimum inhibitory concentration ceftazidime inhibits *Escherichia coli* biofilm formation by influencing the levels of the *ibpA* gene and extracellular indole. *J Chemother*. 2020;32(1):7-14. doi:10.1080/1120009X.2019.1678913
49. Qu S, Dai C, Shen Z, et al. Mechanism of Synergy Between Tetracycline and Quercetin Against Antibiotic Resistant *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2019;10:2536. Published 2019 Nov 22. doi:10.3389/fmicb.2019.02536
50. Rodríguez-Villodres Á, Gil-Marqués ML, Álvarez-Marín R, et al. Extended-spectrum resistance to β -lactams/ β -lactamase inhibitors (ESRI) evolved from low-level resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(1):77-85. doi:10.1093/jac/dkz393
51. Lucas AE, Ito R, Mustapha MM, et al. Frequency and Mechanisms of Spontaneous Fosfomycin Nonsusceptibility Observed upon Disk Diffusion Testing of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2017;56(1):e01368-17. Published 2017 Dec 26. doi:10.1128/JCM.01368-17
52. Komp Lindgren P, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(10):3222-3232. doi:10.1128/aac.47.10.3222-3232.2003
53. Jin M, Lu J, Chen Z, et al. Antidepressant fluoxetine induces multiple antibiotics resistance in *Escherichia coli* via ROS-mediated mutagenesis. *Environ Int*. 2018;120:421-430. doi:10.1016/j.envint.2018.07.046
54. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*. 2013;4(3):223-229. doi:10.4161/viru.23724
55. Seaver LC, Imlay JA. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2001;183(24):7173-7181. doi:10.1128/JB.183.24.7173-7181.2001
56. Johnson PJ, Levin BR. Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet*. 2013;9(1):e1003123. doi:10.1371/journal.pgen.1003123

Referencia de la imagen del título:

Fine Art America. 2020. *E. Coli Bacteria By Centre For Infections/Public Health England/Science Photo Library*. [online] Available at: <<https://fineartamerica.com/featured/18-e-coli-bacteria-centre-for-infectionspublic-health-englandscience-photo-library.html>> [Accessed 26 August 2020].