

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Evaluación biológica de un conjugado sideróforo-antibiótico
basado en el sideróforo amonabactina de la bacteria patógena

Aeromonas salmonicida

Avaliación biolóxica dun conxugado sideróforo-antibiótico
baseado no sideróforo amonabactina da bacteria patóxena

Aeromonas salmonicida

Biological evaluation of a siderophore-antibiotic conjugate based
on the amonabactin siderophore from the pathogenic bacterium

Aeromonas salmonicida

Alumna: Lía Jove Filgueiras

Directores: Carlos Jiménez González, Alejandro Beceiro Casas

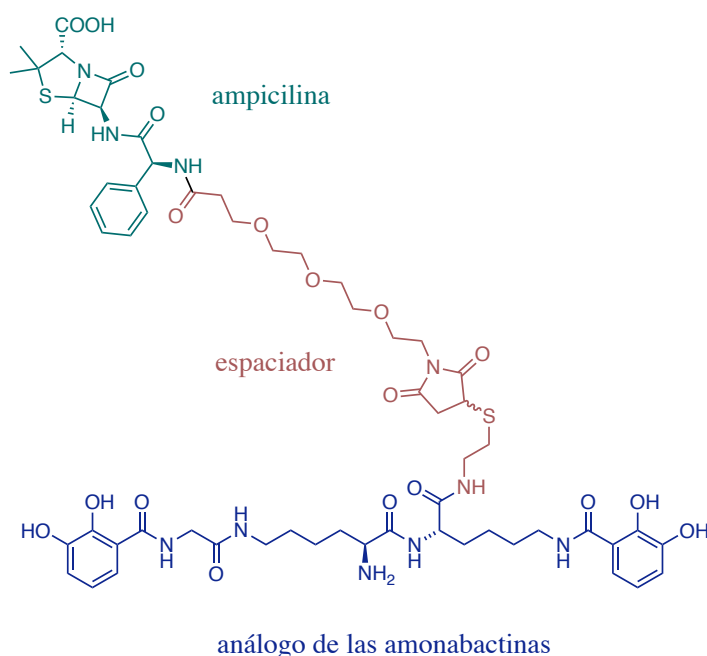
Curso: 2020-2021. **Convocatoria:** septiembre 2021

ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosín trifosfato
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CSA	Conjugado sideróforo-antibiótico
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
EA	Fragmento espaciador-ampicilina
ESI	Ionización por Electrospray
h	Horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
Hz	Hercios
K_{Fe}	Constante de formación de complejos con el hierro
M	Molar
m/z	Relación carga-masa
PEG	Polietilenglicol
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
subsp.	Subespecie
Trp	Triptófano
UFC	Unidad formadora de colonias
UV	Ultravioleta

RESUMEN

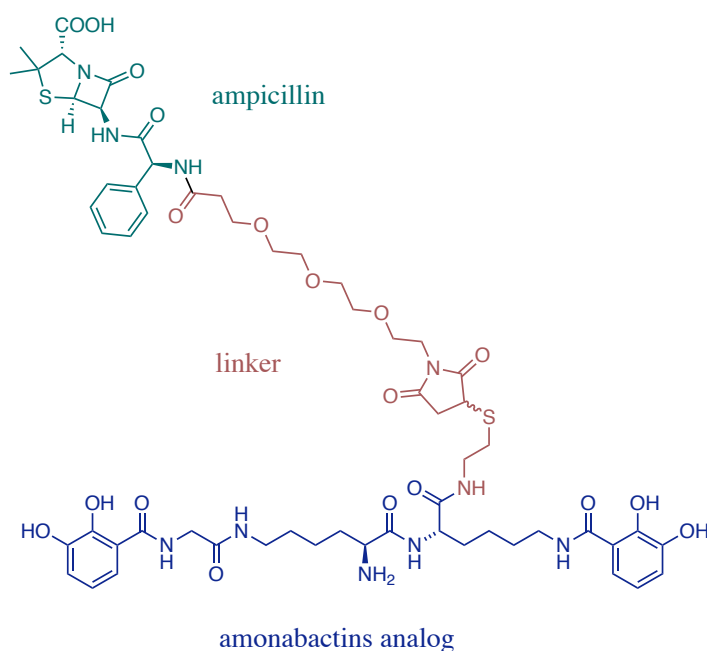
La aparición y propagación de resistencias frente a los agentes antimicrobianos se ha visto acelerada en los últimos años, provocando una crisis sanitaria a nivel mundial y poniendo de manifiesto la necesidad urgente de desarrollar nuevos fármacos más efectivos. Una de las tendencias actuales para enfrentarse a las bacterias patógenas multirresistentes se basa en el uso de estrategias tipo “caballo de Troya”, que emplean portadores moleculares reconocidos por receptores específicos para facilitar la penetración en las células y limitar, en algunos casos, la aparición de resistencias. En el presente trabajo se llevó a cabo la evaluación biológica de un conjugado sideróforo-antibiótico con el que se pretende aprovechar el mecanismo de captación de hierro mediado por sideróforos para promover la absorción activa de un antibiótico. Para su construcción, el vector de entrada seleccionado fue un análogo de las amonabactinas, un sideróforo de la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, y como antibiótico se empleó ampicilina. Se determinó la concentración mínima inhibitoria tanto del conjugado sideróforo-antibiótico como del fragmento espaciador-ampicilina (sin vector de entrada), y se compararon con la ampicilina libre. Los resultados parecen indicar la presencia de un mecanismo mediado por el análogo de las amonabactinas que facilita la entrada del conjugado mejorando su actividad respecto a la esperada para su peso molecular. Además, se inhibe el crecimiento bacteriano con el fragmento espaciador-ampicilina, lo que demuestra que el espaciador no impide la unión de la ampicilina a su diana celular.



Palabras clave: sideróforo, nuevos antibióticos, “caballo de Troya”, amonabactinas, conjugados sideróforo-antibiótico, multirresistencia.

ABSTRACT

The emergence and spread of resistance to antimicrobial agents has accelerated in recent years, causing a global health crisis and highlighting the urgent need to develop new more effective drugs. One of the current trends in dealing with multidrug-resistant pathogenic bacteria is based on the use of “Trojan horse” strategies, which employ molecular carriers recognized by specific receptors to facilitate cell penetration and limit, in some cases, the emergence of resistance. In the present work, the biological evaluation of a siderophore-antibiotic conjugate was carried out to exploit the iron uptake mechanism mediated by siderophores to promote the active absorption of an antibiotic. For its construction, the selected input vector was an analog of amonabactins, siderophores from the pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, and ampicillin was used as the antibiotic. The minimum inhibitory concentration of both the siderophore-antibiotic conjugate and the linker-ampicillin fragment (without input vector) were determined and compared to that of free ampicillin. The results seem to indicate the presence of a mechanism mediated by the amonabactin analog that facilitates the entry of the conjugate, improving its activity with respect to that expected for its molecular weight. In addition, bacterial growth is inhibited by the linker-ampicillin fragment, demonstrating that the linker does not prevent the binding of ampicillin to its cell target.



Key words: siderophore, new antibiotics, “Trojan Horse”, amonabactin, siderophore-antibiotic conjugate, multiresistant.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LOS SIDERÓFOROS.....	1
1.2. SIDEROMICINAS NATURALES Y CONJUGADOS SINTÉTICOS	4
2. ANTECEDENTES	7
3. OBJETIVOS	9
4. MATERIAL Y MÉTODOS	10
4.1 MICROORGANISMOS	10
4.2 MEDIOS DE CULTIVO.....	12
4.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)	12
4.4 TRATAMIENTO Y REPRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
6. PERSPECTIVAS DE FUTURO	21
7. CONCLUSIONES.....	22
8. CONCLUSIONS	23
9. BIBLIOGRAFÍA.....	24
10. ANEXOS	26
10.1. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS PREPARADOS	26
10.2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS PREPARADOS.....	27

1. INTRODUCCIÓN

El aumento de la prevalencia de las enfermedades infecciosas inducidas por patógenos bacterianos, así como la aparición y propagación de resistencias a terapias antimicrobianas en entornos hospitalarios y comunitarios, está provocando una crisis de salud pública a nivel mundial (Fan and Fang, 2021). El número de cepas resistentes se ha visto incrementado en las últimas décadas debido a la disminución de la eficacia de los antibióticos actuales, reduciendo en gran medida el número de terapias disponibles y aumentando la morbilidad, la mortalidad y los gastos derivados del tratamiento de estas infecciones (Mislin and Schalk, 2014; Chairatana, Zheng and Nolan, 2015).

Los antibióticos de amplio espectro tradicionales presentan dianas terapéuticas altamente conservadas y su mecanismo de entrada se basa, mayoritariamente, en la difusión pasiva mediada por porinas. Su uso excesivo contribuye a la rápida selección de bacterias patógenas que adquieren resistencia a través de cuatro mecanismos principales: la disminución de la permeabilidad de la membrana, la expulsión a través de bombas de eflujo, la destrucción enzimática del antibiótico y la modificación de la diana terapéutica. Por tanto, el desafío principal en el diseño de nuevos antibióticos consiste en superar los mecanismos de resistencia existentes y retrasar la aparición de mecanismos de resistencia nuevos (Wencewicz and Miller, 2018).

Una de las tendencias actuales para el desarrollo de nuevos antibióticos se basa en estrategias tipo “caballo de Troya”, que consisten en el uso de moléculas capaces de interactuar con receptores específicos de la membrana bacteriana para facilitar la penetración en la célula, aumentar la concentración intracelular y limitar, en algunos casos, la aparición de resistencias. Esta es la línea que se sigue en el presente trabajo coordinado, en donde se propone la preparación y evaluación biológica de un conjugado molecular de tipo sideromicina, capaz de aprovechar las rutas de transporte de hierro mediadas por sideróforos para promover la absorción activa de los agentes terapéuticos y aumentar así su concentración intracelular (Wencewicz and Miller, 2018; Sanderson *et al.*, 2020; Skwarecki, Nowak and Milewska, 2020).

1.1 Los sideróforos

Los sideróforos (del griego “portadores de hierro”) son compuestos de bajo peso molecular (500-1500 Da) producidos por bacterias, hongos y gramíneas, con una alta afinidad y selectividad por el hierro(III) (Hider and Kong, 2010).

La captación de hierro es un proceso biológico fundamental para la mayoría de organismos vivos, pues se trata de un elemento esencial que actúa como cofactor de enzimas involucradas en multitud de procesos celulares básicos, tales como la síntesis de ácidos nucleicos, la transferencia de electrones, la protección contra especies reactivas de oxígeno y la regulación génica (Schalk, 2008; Hider and Kong, 2010). Sin embargo, a pesar de su abundancia en la corteza terrestre, su biodisponibilidad es muy limitada y disminuye en gran medida a pH neutro y bajo condiciones aerobias debido a la formación de hidróxidos férricos insolubles. Estas condiciones son las que se dan en un contexto patogénico donde, además, el hierro se encuentra “secuestrado” por proteínas de almacenamiento del huésped, como la transferrina y la lactoferrina, llegando a alcanzar concentraciones de 10^{-24} M en el suero humano (Chen *et al.*, 2017).

Por tanto, la adquisición de niveles adecuados de hierro, entre 10^{-8} y 10^{-6} M, es un factor fundamental para la supervivencia de los patógenos y la colonización del hospedador durante las infecciones bacterianas. Este hecho convierte a los sideróforos en importantes factores de virulencia que se presentan como prometedoras dianas terapéuticas (Centola, Xue and Wilks, 2020; Sargun *et al.*, 2021).

1.1.1 Biosíntesis y mecanismos de entrada

La biosíntesis de sideróforos se encuentra fuertemente condicionada por los niveles de hierro a través de proteínas reguladoras de la captación férrica (Fur). En condiciones de restricción de hierro se activa la maquinaria transcripcional y comienza tanto la producción de las enzimas necesarias para la biosíntesis de sideróforos, como de las proteínas implicadas en su reconocimiento, transporte y procesamiento (Wilson *et al.*, 2016; Wencewicz and Miller, 2018).

La mayoría de los sideróforos son sintetizados por unos complejos proteicos multifuncionales conocidos como sintetetas de péptidos no ribosómicos (*nonribosomal peptide synthetase*, NRPS). Estos complejos llevan a cabo la biosíntesis en el citoplasma, tras la cual los sideróforos son exportados al espacio extracelular. Una vez allí, forman complejos estables con el hierro(III) reconocidos por proteínas específicas que inician un mecanismo de transporte activo. Este mecanismo difiere ligeramente entre bacterias Gram-negativas y bacterias Gram-positivas debido a la diferente composición de su envoltura celular (Fischbach and Walsh, 2006; Kadi and Challis, 2009).

En bacterias Gram-negativas, con dos membranas celulares separadas por un espacio periplasmático, los complejos hierro-sideróforo son reconocidos por un receptor de membrana externa específico (*outer-membrane receptor*, OMR). Tras la unión, el receptor experimenta un cambio conformacional que permite el transporte activo del complejo al espacio periplasmático gracias a la energía protón-motriz aportada por el complejo proteico TonB. Una vez en el periplasma, los sideróforos férricos son transportados por una proteína de unión periplasmática (*periplasmic binding protein*, PBP) hasta la membrana interna, donde son bombeados al citoplasma a través de un transportador de tipo ABC (*ATP Binding Casette*) dependiente de ATP. Alcanzado el citoplasma, el hierro puede ser liberado por reducción o mediante la degradación enzimática del sideróforo. En algunos casos, como ocurre en *Pseudomonas aeruginosa*, se observan mecanismos alternativos en los que los complejos son hidrolizados en el periplasma, de forma que sólo el hierro es capaz de atravesar la membrana interna (Fan and Fang, 2021).

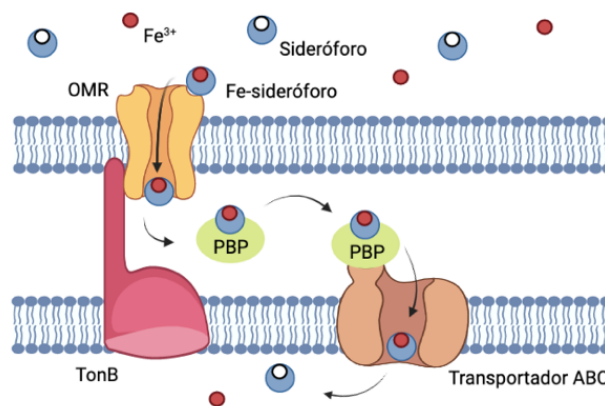


Figura 1. Mecanismo de transporte de los complejos Fe-sideróforo en bacterias Gram-negativas.

En bacterias Gram-positivas, con una única membrana, los complejos hierro-sideróforo son importados directamente a través de una permeasa ubicua de la membrana celular tras el reconocimiento por una proteína SBP (*siderophore-binding protein*) (Fan and Fang, 2021).

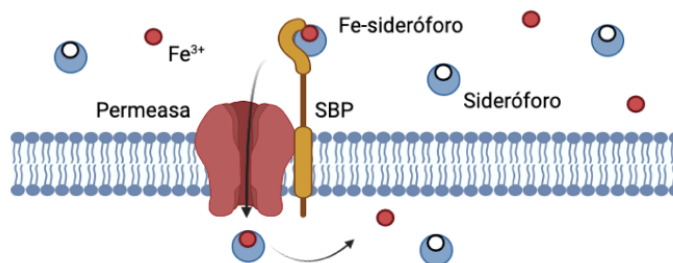


Figura 2. Mecanismo de transporte de los complejos Fe-sideróforo en bacterias Gram-positivas.

1.2. Sideromicinas naturales y conjugados sintéticos

Las sideromicinas son metabolitos secundarios biosintetizados por algunos microorganismos como arma evolutiva para la supervivencia en condiciones de hierro limitado. Estructuralmente, están constituidas por un resto sideróforo y un antibiótico. El sideróforo actúa como vector de direccionamiento al ser reconocido por receptores específicos del organismo diana, mientras que el antibiótico, una vez internalizado, actúa como antimicrobiano (Wencewicz and Miller, 2018; Southwell, Black and Duhme-Klair, 2021).

Estos compuestos han servido de inspiración para la preparación de conjugados sintéticos que se constituyen por tres componentes básicos: un análogo de sideróforo, un espaciador y un antibiótico (Figura 3). El conjugado seleccionado en este estudio para la evaluación de su actividad biológica presenta como sideróforo un análogo de las amonabactinas, como antibiótico la ampicilina y como espaciador un derivado del polietilenglicol (Wencewicz and Miller, 2018).

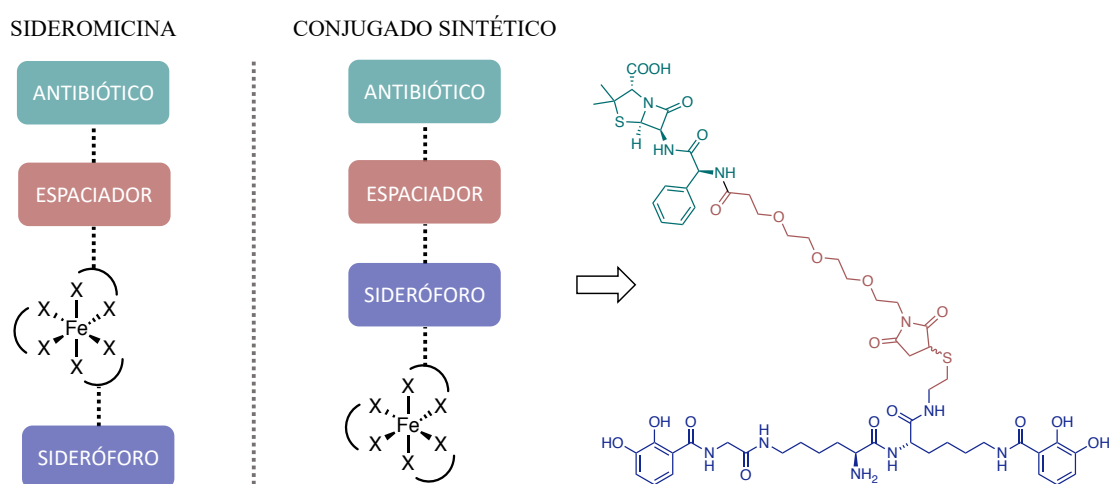


Figura 3. Esquema de la estructura básica de una sideromicina, un conjugado sintético y su correspondencia con la propuesta de este Trabajo de Fin de Grado.

1.2.1 Elección del antibiótico

Dentro de la amplia gama de antibióticos que pueden ser seleccionados para la preparación de “caballos de Troya” se encuentran los β -lactámicos, que actúan inhibiendo la biosíntesis de la pared bacteriana (Wencewicz and Miller, 2018). Su principal ventaja es que presentan dianas celulares periplasmáticas, lo que simplifica en gran medida el mecanismo de transporte que deben experimentar los conjugados para ser biológicamente activos, pues tan solo deben ser reconocidos e internalizados por los receptores de membrana externa.

Teniendo esto en cuenta, para la preparación del conjugado se seleccionó la ampicilina, un antibiótico β -lactámico perteneciente al grupo de las penicilinas. Estas se caracterizan estructuralmente por presentar, además del anillo β -lactámico, un anillo de tiazolidina formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una cisteína y una valina (Figura 4). La cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras, tolera un alto grado de sustituciones, por lo que su conjugación con sideróforos voluminosos no impide la unión a su diana celular (Marín and Gudiol, 2003).

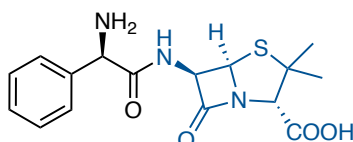


Figura 4. Estructura de la ampicilina con el ácido 6-aminopenicilánico que caracteriza al grupo de las penicilinas, resaltado en azul.

1.2.2 Elección del espaciador

El espaciador empleado tiene como objetivo principal permitir la unión de los dos componentes del conjugado a través de enlaces covalentes pero manteniéndolos lo suficientemente separados para que no interfieran entre ellos. Además, debe ser resistente a las condiciones extracelulares, estable durante la translocación, no interferir en el reconocimiento del sideróforo y no impedir la unión del antibiótico con la diana celular. Por lo tanto, los puntos de unión del espaciador con el sideróforo y el antibiótico son clave y su diseño debe ser previamente optimizado para garantizar la actividad biológica del “caballo de Troya” (Mislin and Schalk, 2014).

Existen dos clases principales de espaciadores, los escindibles y los no escindibles. En el caso de los conjugados que emplean estructuras β -lactámicas como antibióticos, no es necesaria la liberación del antibiótico para mantener la actividad, por lo que los espaciadores no escindibles son los más utilizados (Mislin and Schalk, 2014).

1.2.3 Elección del sideróforo

El sideróforo actúa como un vector de entrada y determina el espectro de actividad antibacteriana, por lo que conocer su selectividad es un factor clave a la hora de su selección para la construcción de conjugados.

En este trabajo se ha seleccionado un análogo de las amonabactinas P750 y P789 (Figura 5) como vector de entrada para los conjugados moleculares. La utilización de un análogo permite simplificar el procedimiento sintético, pero sin sacrificar los requerimientos estructurales básicos

para el reconocimiento molecular de tal forma que se logra mantener una actividad siderófora similar a la de las amonabactinas naturales.

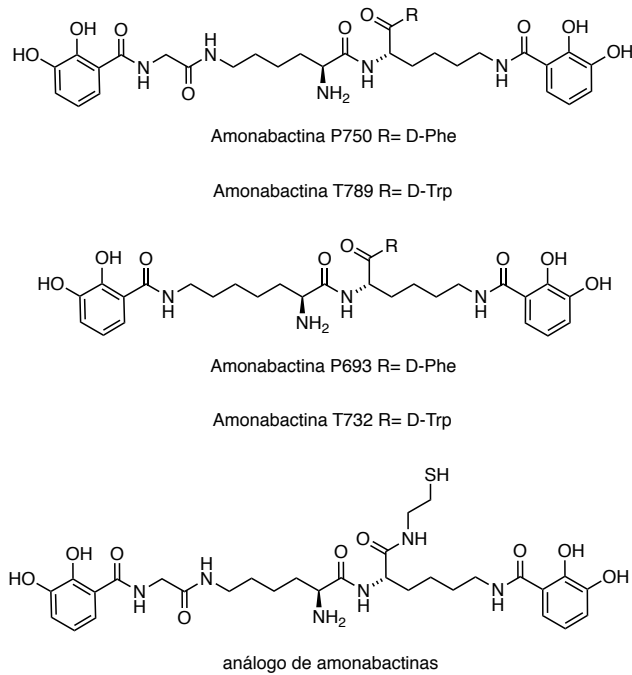


Figura 5. Estructura química de las amonabactinas y del análogo simplificado seleccionado como vector de direccionamiento.

Las amonabactinas son unos de los sideróforos producidos por la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, una γ -proteobacteria Gram-negativa que provoca furunculosis en peces, enfermedad que causa importantes pérdidas económicas en la industria de la acuicultura a nivel mundial. Perteneciente a la familia de los catecolatos, se caracteriza estructuralmente por presentar un esqueleto de dos lisinas con una glicina opcional, enlazando los dos residuos catecol que actúan como ligandos quelatantes del hierro(III), y una cadena lateral de triptófano o fenilalanina que puede ser sustituida sin suponer una pérdida de la actividad (Rey-Varela *et al.*, 2019).

2. ANTECEDENTES

La preparación del conjugado sideróforo-antibiótico se llevó a cabo en el grupo PRONAMAR, adscrito a la Facultad de Ciencias y al Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) de la Universidad de A Coruña, mientras que la evaluación de su actividad biológica, objetivo del presente Trabajo de Fin de Grado, se desarrolló en el grupo de Microbiología Clínica adscrito al Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

Una de sus líneas de investigación, en la que existe una colaboración entre ambos grupos, se enfoca en el desarrollo de nuevos tratamientos y diagnósticos contra enfermedades infecciosas basados en los mecanismos de captación de Fe(III) mediados por sideróforos. Dentro de esta línea, se consiguió identificar el receptor de membrana de las amonabactinas (FstC) en *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* y definir los requerimientos estructurales mínimos para el reconocimiento molecular (Rey-Varela *et al.*, 2019).

Este avance permitió el diseño y la evaluación de la actividad biológica de conjugados moleculares con tres antibióticos diferentes siguiendo una estrategia tipo “caballo de Troya” (Figura 6), así como de una sonda fluorescente para estudiar la selectividad de los mismos.

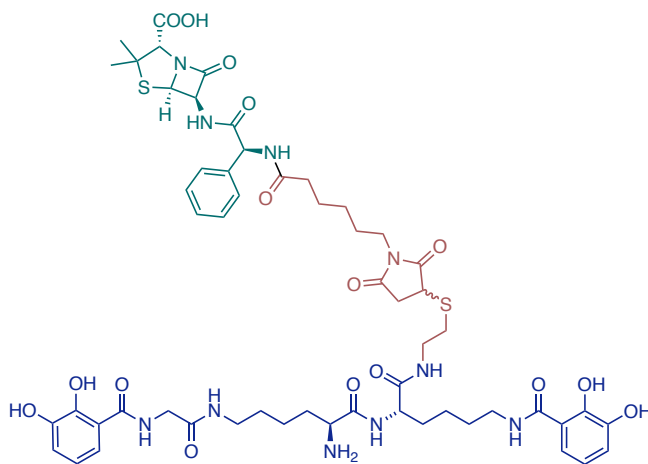
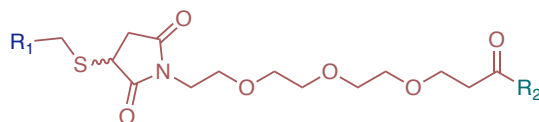


Figura 6. Estructura química de uno de los conjugados moleculares utilizados como “caballo de Troya” en el que se utilizó la ampicilina (verde) como antibiótico.

Los resultados obtenidos en los ensayos con la sonda fluorescente demostraron que los conjugados basados en análogos de las amonabactinas son reconocidos e internalizados por un amplio grupo de patógenos multirresistentes Gram-negativos y algún Gram-positivo. Desafortunadamente, los conjugados preparados con una estructura equivalente a la de la sonda fluorescente, pero en los que el fluoróforo fue sustituido por 3 antibióticos conocidos, no presentaron actividad antimicrobiana.

Una posible explicación a la ausencia de actividad podría ser que, debido a su proximidad, el sideróforo interfiera en la interacción del antibiótico con su diana celular. Por esta razón, en el presente trabajo se propuso aumentar la distancia entre ambos componentes empleando un espaciador con tres unidades de etilenglicol (Figura 7), tratando así de disminuir dicha interferencia (Zheng and Nolan, 2014).



R₁ = análogo de las amonabactinas

R₂ = ampicilina

Figura 7. Estructura general del espaciador derivado del polietilenglicol seleccionado para la unión del análogo de las amonabactinas y la ampicilina.

De esta forma, en el TFG del Grado en Química se llevó a cabo la síntesis del conjugado sideróforo-antibiótico (**CSA**) cuya obtención fue confirmada por espectrometría de masas de alta resolución y por espectrometría de RMN-¹H del crudo de reacción (ANEXOS). Sin embargo, tanto el espectro de RMN-¹H como el espectro UV del producto purificado, reflejaron la existencia de una mezcla de compuestos que puede ser el resultado de una degradación de la ampicilina durante el proceso de purificación. Esto hace que los resultados derivados de los diferentes ensayos realizados para la evaluación de su actividad solo puedan ser tomados como una referencia, pues será necesario evaluar otras condiciones de reacción y purificación que permitan su obtención de una forma pura para que puedan ser significativos.

3. OBJETIVOS

El objetivo del presente Trabajo de Fin de Grado es la evaluación de la actividad biológica de un conjugado sideróforo-antibiótico con el que se pretende aprovechar el mecanismo de adquisición de hierro mediado por sideróforos para promover la absorción activa de moléculas con posible actividad terapéutica. Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del conjugado sideróforo-antibiótico (**CSA**) y comparar su actividad con la de la ampicilina libre que servirá como referencia para evaluar el efecto del vector de entrada (análogo de las amonabactinas)
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del fragmento espaciador-ampicilina (**EA**) y comparar su actividad con la del conjugado sideróforo-antibiótico (**CSA**), para evaluar el efecto del vector de entrada, y con la de la ampicilina libre, para evaluar el papel que juega el espaciador en la unión de la ampicilina a su diana celular.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Microorganismos

Se estudiaron un total de 10 cepas bacterianas de 6 especies patógenas entre las que se incluyeron 2 cepas de *Enterococcus faecalis* (la cepa ATCC 29272 y una cepa clínica), 3 cepas de *Acinetobacter baumannii* (la cepa ATCC 17978 y dos cepas clínicas), 2 cepas de *Escherichia coli* (la cepa ATCC 25922 y la TG1), una cepa clínica de *Enterococcus faecium*, una cepa clínica de *Aeromonas hydrophila* y la cepa ATCC 29231 de *Staphylococcus aureus*. Las cepas ATCC son microorganismos de referencia certificados procedentes de la colección americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection*).

4.1.1 *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii es un bacilo Gram-negativo que está causando una alarma sanitaria debido a su amplio espectro de resistencia a antibióticos. Como patógeno oportunista, a pesar de su baja virulencia, es capaz de causar infecciones que, mayoritariamente, se producen en la sangre o en órganos con un alto contenido en líquido, como los pulmones o el tracto urinario. La mayoría de los genes de resistencia que presentan parecen haber sido adquiridos por transferencia horizontal y muchos de ellos se agrupan en una única isla genómica (NCBI Genomes, 2021 (a)).

4.1.2 *Aeromonas hydrophila*

A. hydrophila es un bacilo Gram-negativo que está cobrando importancia como patógeno humano, donde puede causar gastroenteritis y septicemia, principalmente debido al desarrollo de resistencia a diferentes antibióticos. Uno de los principales factores de virulencia es la aerolisina, una toxina que se une a los receptores de membrana formando complejos heptaméricos que dan lugar a poros que permiten el paso de pequeñas moléculas, aumentando la permeabilidad de la membrana y provocando la muerte celular y la destrucción de tejidos (NCBI Genomes, 2021 (b)).

4.1.3 *Enterococcus faecalis*.

E. faecalis es un patógeno oportunista Gram-positivo, presente en la flora intestinal humana sana, que puede causar infecciones del tracto urinario, bacteremia o endocarditis infecciosa y cuya incidencia en el ámbito hospitalario está aumentando debido a la aparición de cepas resistentes a antibióticos. Produce una toxina citolisínica que se encuentra codificada por varios elementos

genéticos transponibles, islas de patogenicidad y plásmidos conjugativos, que utilizan un sistema de respuesta a las feromonas para iniciar la transferencia genética que permite la disseminación del plásmido a través de las poblaciones (NCBI Genomes, 2021 (c)).

4.1.4 *Enterococcus faecium*

E. faecium es un patógeno oportunista Gram-positivo presente en la flora intestinal humana que, de la misma forma que *E. fecalis*, puede provocar infecciones del tracto urinario, bacteremia y endocarditis infectiva, y cuya incidencia está aumentando debido a la aparición de cepas resistentes a los agentes antimicrobianos. Además, la transferencia horizontal de sus genes de resistencia es responsable del incremento de cepas de *S. aureus* resistentes a la vancomicina. No se conoce mucho a cerca de ellos pero parecen estar relacionados con un gen que codifica para una adhesina de superficie (NCBI Genomes, 2021 (d)).

4.1.5 *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo Gram-negativo anaerobio facultativo que forma parte de la microbiota gastrointestinal. Su fácil cultivo en el entorno del laboratorio y su susceptibilidad para la manipulación genética lo han convertido en uno de los organismos modelo de procariontes más estudiados. Es una especie muy diversa que engloba tanto cepas no patógenas como patógenas, que causan infecciones del tracto urinario, meningitis neonatal o enfermedades de tipo intestinal. Las cepas patógenas suelen presentar factores de virulencia codificados en plásmidos extracromosómicos o islas de patogenicidad que probablemente hayan sido adquiridos por transferencia horizontal e incluso se hayan integrado en el cromosoma a través de la transposición de bacteriófagos o plásmidos (NCBI Genomes, 2021 (e)).

4.1.6 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es patógeno oportunista Gram-positivo considerado como el principal causante de infecciones nosocomiales (infecciones adquiridas en el ambiente hospitalario). Desde su descubrimiento, continúa siendo el principal causante de mortalidad y es responsable de una gran variedad de infecciones entre las que se encuentran furúnculos, orzuelos, impétigo y otras infecciones cutáneas superficiales. Además, también puede ser causa de infecciones más graves, especialmente en los enfermos crónicos o inmunodeprimidos, como neumonía, abscesos profundos, osteomielitis, endocarditis, flebitis, mastitis y meningitis (NCBI Genomes, 2021 (f)).

4.2 Medios de cultivo

Para la determinación de la CMI se utilizó un medio nutritivo con restricción de hierro que se preparó a partir del medio Mueller Hinton II con cationes ajustados NutriSelect® Plus de la casa comercial *Sigma-Aldrich*.

4.2.1 Medio Mueller Hinton II, cationes ajustados.

El medio Mueller Hinton II está diseñado para llevar a cabo pruebas cuantitativas de sensibilidad de bacterias aerobias de crecimiento rápido y anaerobias facultativas aisladas de muestras clínicas. Por litro de agua purificada contiene 3 g de extracto de carne bovina, 17.5 g de hidrolizado ácido de caseína y 1.5 g de almidón. Además, está suplementado con sales para proporcionar 20-25 mg/L de calcio y 10-12.5 mg/L de magnesio.

4.2.2 Medio Mueller Hinton II, sin hierro.

El medio Mueller Hinton II sin hierro se preparó añadiendo 100 g de resina Chelex® 100 (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*) a 1 L de medio Mueller Hinton II (cationes ajustados) previamente esterilizado en autoclave a 120°C durante 10 min. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h para eliminar los cationes presentes en el medio y, transcurrido ese tiempo, se filtró para eliminar la resina a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.2 µm. A continuación, se ajustó el pH a 7.3 con ácido clorhídrico 0.1 M y se complementó con calcio (CaCl₂), magnesio (MgCl₂) y zinc (ZnSO₄) hasta concentraciones finales de 22.5 µg/ml (rango, 20-25 µg/ml), 11.25 µg/ml (rango, 10-12.5 µg/ mL) y 10 µM (0.56 µg/mL; rango 0.5-1.0 µg/mL), respectivamente. Finalmente, se pasó nuevamente a través de un filtro de 0.2 µm y se conservó en nevera (4°C) hasta su uso (Hackel *et al.*, 2019).

4.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se aplicó el método de dilución en caldo, que se basa en la evaluación del crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de un agente antimicrobiano que se encuentra diluido en el propio medio de cultivo. A diferencia de los métodos de difusión en agar, la actividad antimicrobiana se determina a partir de una escala discontinua, generalmente concentraciones crecientes en base 2, por lo que la CMI calculada por este método será una estimación del valor real, que debe encontrarse entre el obtenido experimentalmente y la concentración inmediatamente anterior (Cantón *et al.*, 2000).

4.3.1 Preparación de los agentes antimicrobianos

El primer paso consistió en la preparación de disoluciones madre de los tres agentes antimicrobianos de estudio a una concentración de 10 mg/mL. La disolución de la ampicilina en forma de sal de sodio procedente de la casa comercial *Sigma-Aldrich* se llevó a cabo en agua para preparaciones inyectables procedente de la casa comercial *B. Braun*, mientras que para la disolución del fragmento espaciador-ampicilina (**EA**) y del conjugado sideróforo-antibiótico (**CSA**), que fueron sintetizados en forma de sales de potasio, se utilizó dimetilsulfóxido para biología molecular procedente de la casa comercial *Sigma-Aldrich*. Cabe mencionar que una concentración por encima del 2-3% de DMSO en el medio de cultivo puede provocar la inhibición del crecimiento bacteriano. Por tanto, en caso de alcanzar en los ensayos concentraciones próximas a esos valores, deben introducirse controles negativos con DMSO.

4.3.2 Preparación de las placas aplicando el método de microdilución

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de fondo en U que permitieron la realización simultánea de 8 experimentos a 11 concentraciones diferentes de antimicrobiano con los correspondientes controles positivos de crecimiento. Para su preparación, se añadieron 100 μ L de medio de cultivo líquido sin antimicrobiano a cada uno de los pocillos a excepción de la columna 12, donde se añadieron 200 μ L de medio de cultivo con la mayor concentración de agente antimicrobiano que se va a evaluar. A continuación, se realizaron las microdiluciones seriadas tomando 100 μ L de la última columna y resuspendiéndolos en el pocillo adyacente de forma secuencial hasta alcanzar la segunda columna, como se representa en el esquema de la Figura 8A. La primera columna, sin agente antimicrobiano, se utilizó como control positivo del crecimiento.

4.3.3 Preparación del inóculo e inoculación.

La preparación del inóculo se llevó a cabo por el método de suspensión directa de colonias. Para ello, se tomaron 2 colonias de tamaño estándar de una placa de cultivo de 24 h con ayuda de un hisopo estéril y se resuspendieron en 5 mL de suero fisiológico estéril ajustando el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala MacFarland (densidad celular aproximada de $1.5 \cdot 10^8$ UFC/mL) (Gómez-Garcés, Aracil and Gil, 2009). A continuación, se realizó una dilución 1/20 resuspendiendo 0.25 mL del mismo en 5 mL de suero fisiológico y se prepararon las alícuotas necesarias para la inoculación en una placa adicional. Finalmente, se añadieron 5 μ L de inóculo a cada uno de los pocillos de la placa, lo que equivale a unas $4 \cdot 10^4$ UFC de forma aproximada.

4.3.4 Incubación y lectura de los resultados

Una vez preparadas las placas, se incubaron durante 20-24 h a 37°C para permitir el crecimiento bacteriano y, transcurrido ese tiempo, se procedió a la lectura de los resultados empleando un lector con espejo (Figura 8B). La CMI determinada será la concentración de antimicrobiano correspondiente al primer pocillo en el que no se observó crecimiento bacteriano.

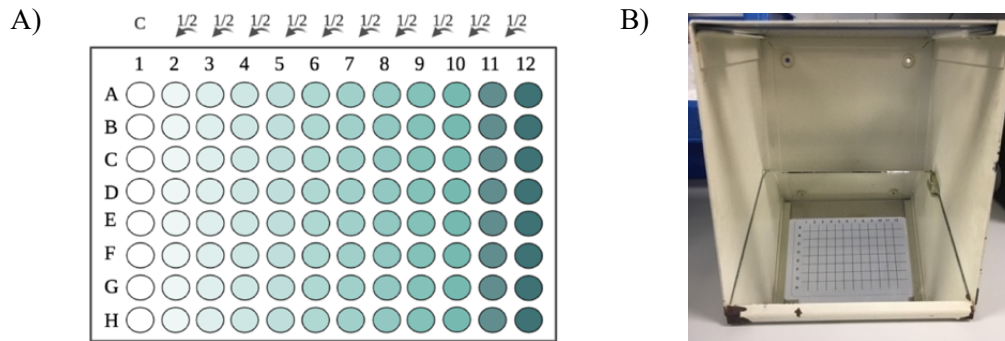


Figura 8. A) Esquema del patrón de microdilución aplicado para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias. B) Lector en espejo utilizado para la determinación de CMIs de forma visual e interpretada. Para antibióticos de uso rutinario se emplean métodos automatizados.

4.4 Tratamiento y representación de los resultados obtenidos.

Para el tratamiento y la representación gráfica de los resultados obtenidos a partir de los diferentes ensayos se utilizó el software *Prism 9* de *GraphPad*.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El punto de partida para el planteamiento de los diferentes ensayos consistió en la búsqueda de especies sensibles a la ampicilina, que permitiesen la evaluación de la actividad del conjugado sideróforo-antibiótico (CSA) a concentraciones no muy elevadas. Con esta intención, se llevó a cabo un cribado inicial con diferentes cepas bacterianas tanto clínicas, procedentes de aislamientos en pacientes, como cepas ATCC bien caracterizadas, donde se obtuvieron los resultados que se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. CMI's obtenidas para la ampicilina libre, el fragmento espaciador-ampicilina (EA) y el conjugado sideróforo-antibiótico (CSA) expresadas tanto en mg/L (concentración derivada de la lectura directa de la placa) como en μM (transformación necesaria para poder llevar a cabo una comparación de la actividad por mol de ampicilina en el medio).

	Ampicilina		EA		CSA	
	mg/L	μM	mg/L	μM	mg/L	μM
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	16	43	>64	>95	64	48
<i>A. hydrophila</i> cepa clínica	>16	>43	>16	>24	>16	>12
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	10.8	>16	>24	>16	>12
<i>E. coli</i> TG1	1	2.7	>16	>24	>16	>12
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1	2.7	16	24	16	12
<i>E. faecium</i> cepa clínica	32	86	>16	>24	>16	>12
<i>S. aureus</i> ATCC 29231	0.25	0.67	8	12	>16	>12

En esta primera aproximación pudo detectarse inhibición del crecimiento bacteriano en al menos uno de los dos compuestos evaluados frente a *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus*, por lo que nos centraremos en estas tres especies para la discusión de los resultados. Con el resto de especies bacterianas sería necesario evaluar concentraciones mayores de cada compuesto para poder llevar a cabo una comparación de su actividad y, dado que la cantidad de conjugado disponible es limitada, se decidió descartarlas para el estudio. Cabe mencionar que, en adelante, las CMI's se expresarán siempre en molaridad, pues los pesos moleculares de los tres compuestos evaluados no son comparables y, por tanto, una CMI de 16 mg/L no es equivalente en cuanto a moles de ampicilina para el fragmento EA y el conjugado CSA, cuya masa molar es dos veces mayor.

Los resultados obtenidos para las tres especies bacterianas seleccionadas de este primer cribado, se representan en la Figura 9 como promedio y desviación estándar de las dos réplicas realizadas, con el objetivo de facilitar su visualización e interpretación.

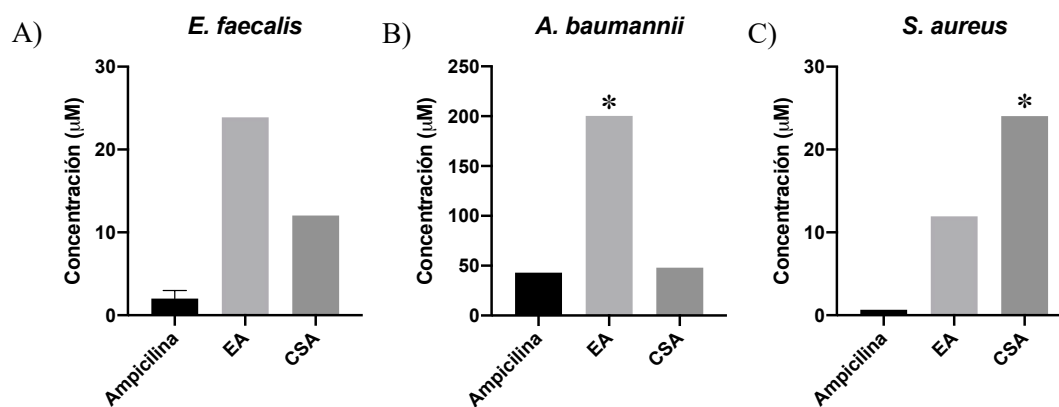


Figura 9. CMI's determinadas para cada uno de los compuestos representadas como promedio y desviación estándar. El asterisco (*) indica que la CMI es igual o mayor al valor representado, pues se observó crecimiento bacteriano a la máxima concentración de compuesto probada.

Teniendo en cuenta que la ampicilina es internalizada por difusión pasiva mediada por porinas, la tendencia esperada en caso de no existir un mecanismo alternativo sería que un aumento significativo del tamaño del compuesto representase una disminución de su actividad. Esta tendencia es la que se observó en *S. aureus*, donde la actividad de la ampicilina libre, con una masa molar de 371.09 g/mol, fue 10 veces mayor que la de la ampicilina unida al espaciador (M= 670.17 g/mol) y esta, a su vez, resultó ser al menos 2 veces mayor que la del conjugado CSA (M= 1332.44 g/mol). Sin embargo, tanto en *A. baumannii* como en *E. faecalis* se observó un aumento de la actividad del conjugado CSA respecto a la del fragmento EA, lo que parece indicar que existe un mecanismo alternativo a la difusión pasiva mediada por porinas que facilita la entrada del mismo, aumentando su concentración intracelular y, como consecuencia, su actividad antimicrobiana.

Otro aspecto a destacar es que las dos especies bacterianas frente a las cuales el fragmento EA mostró actividad, *E. faecalis* y *S. aureus* (ver Tabla 1), son especies Gram-positivas. Esto concuerda con lo esperado, pues la permeabilidad de la pared bacteriana es mucho menor en bacterias Gram-negativas, que a menudo presentan mecanismos de resistencia basados en una reducción del tamaño de poro o del número de porinas presentes en la membrana externa (Prajapati, Kleinekathöfer and Winterhalter, 2021).

Por último, el hecho de que el fragmento EA sea capaz de inhibir el crecimiento bacteriano implica que el espaciador no está impidiendo la unión de la ampicilina a su diana celular periplasmática. Si bien, se observó una clara disminución de la actividad antimicrobiana respecto a la de la ampicilina libre que, a pesar de poder explicarse por el aumento del peso molecular mencionado, no excluye el hecho de que el espaciador pueda estar afectando a la unión. Ambos factores pueden estar contribuyendo y, por esta razón, serán necesarios más estudios para determinar su grado de influencia en el reconocimiento.

De acuerdo con lo expuesto, *E. faecalis* y *A. baumannii*, que parecen presentar el mecanismo mediado por el análogo de amonabactinas de interés, fueron seleccionados como organismos de estudio para llevar a cabo un análisis más exhaustivo. El objetivo del análisis fue determinar la reproducibilidad de los resultados obtenidos y la extensión de los mismos a otras cepas bacterianas.

- *Enterococcus faecalis*.

Para analizar la reproducibilidad de los resultados se repitió el ensayo 5 veces, introduciendo en cada experimento dos réplicas para cada compuesto. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 10 como promedio y desviación estándar.

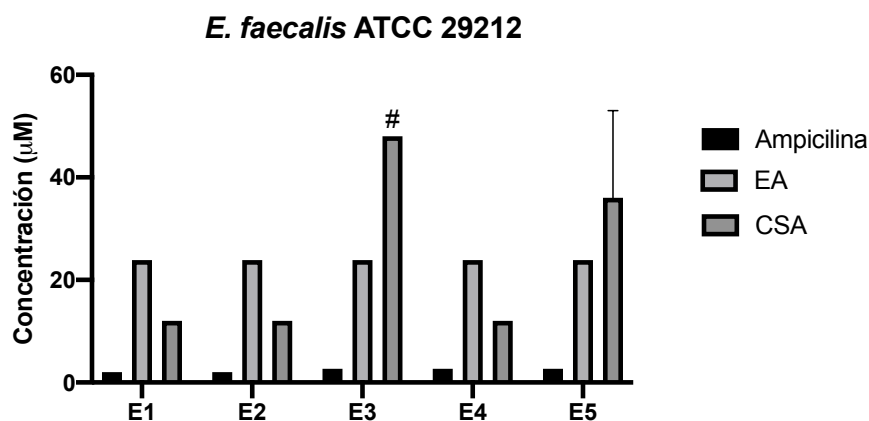


Figura 10. CMI's determinadas para cada uno de los 5 ensayos representadas como promedio y desviación estándar. La almohadilla (#) indica que para la concentración inmediatamente inferior a la representada, que se corresponde con la máxima concentración de ensayo, se observó una disminución del crecimiento bacteriano pero no lo suficientemente significativo como para considerarlo la CMI.

Los tres primeros ensayos se realizaron partiendo de una misma alícuota de disolución madre de cada compuesto, mientras que para los dos últimos se utilizó una nueva. Los resultados evidenciaron que con el paso del tiempo y con los procesos de congelación-descongelación a los que fueron sometidos, el conjugado CSA perdió actividad antimicrobiana (como se observa en el ensayo 3 y el ensayo 5), mientras que el fragmento EA permaneció estable manteniendo su actividad con el tiempo. Esta observación concuerda con la hipótesis de partida, pues si la inversión de la tendencia observada para el conjugado CSA es debida a la existencia de un mecanismo de transporte activo alternativo, una degradación del análogo de las amonabactinas puede impedir el reconocimiento por el receptor de membrana y, por tanto, la internalización del mismo. Además, si la disminución de la actividad fuese debida a una degradación de la ampicilina también debería haberse observado en el fragmento EA, lo cual no ocurre.

Paralelamente, se determinó la actividad antimicrobiana frente a una cepa clínica de *E. faecalis* mediante la realización de tres ensayos con dos réplicas cada uno, obteniendo los resultados que se representan en la Figura 11. Temporalmente, se corresponden con los ensayos 3, 4 y 5 de la cepa *E. faecalis* ATCC 29212, por lo que tan solo el segundo de ellos puede ser considerados como válido, pues en los dos casos restantes se debe presuponer una degradación del conjugado CSA.

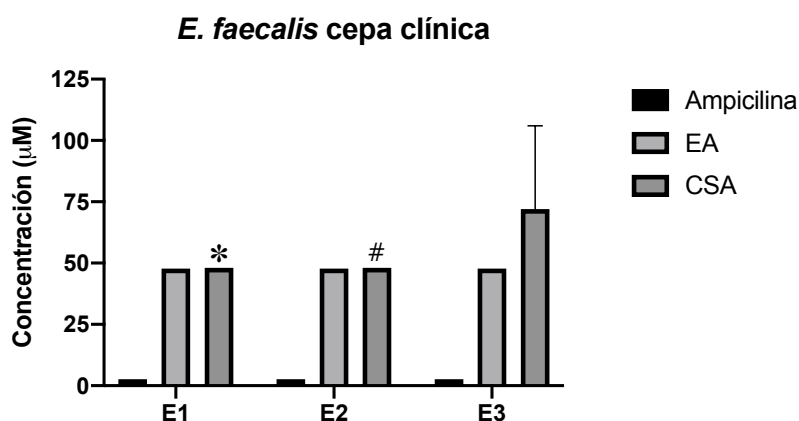


Figura 11. CMI's determinadas para cada uno de los 3 ensayos representadas como promedio y desviación estándar. El asterisco (*) indica que la CMI es igual o mayor al valor representado, pues se observó crecimiento bacteriano a la máxima concentración de compuesto probada. La almohadilla (#) indica que para la concentración inmediatamente inferior a la representada, que se corresponde con la máxima concentración de ensayo, se observó una disminución del crecimiento bacteriano pero no lo suficientemente significativo como para considerarlo la CMI.

Al comparar los resultados obtenidos en el segundo ensayo de la cepa clínica de *E. faecalis* con los de la cepa ATCC 29212, se observa como la actividad del fragmento EA disminuye, pasando de una CMI de 23.37 µM a 47.75 µM, lo que indica que la permeabilidad de la membrana es ligeramente menor en la cepa clínica. En cuanto al conjugado CSA, a una concentración de 24.06 µM se observó una disminución del crecimiento bacteriano, pero no lo suficientemente representativo como para considerarlo una inhibición del crecimiento. Por tanto, la CMI debe encontrarse en un valor intermedio entre 24.06 y 48.03 µM, lo que supone que la tendencia es la misma que la observada para la cepa *E. faecalis* ATCC 29212, pues no se aprecia el efecto esperado por el aumento del tamaño del compuesto en la actividad antimicrobiana.

- *Acinetobacter baumannii*.

Del mismo modo que para *E. faecalis*, en primer lugar se analizó la reproducibilidad de los resultados. Para ello, se repitió de nuevo el ensayo dos veces introduciendo en cada experimento dos réplicas por compuesto evaluado, obteniendo de esta forma los resultados que se representan en la Figura 12. El segundo ensayo se llevó a cabo el mismo día que el E3 de la cepa ATCC de *E. faecalis*, por lo que se asume una degradación del conjugado **CSA** y no se tendrán en cuenta los resultados obtenidos a partir del mismo.

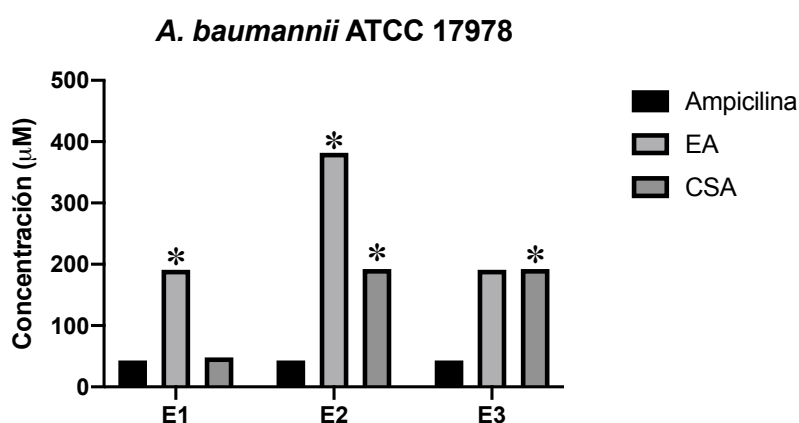


Figura 12. CMI's determinadas para cada uno de los 3 ensayos representadas como promedio y desviación estándar. El asterisco (*) indica que la CMI es igual o mayor al valor representado, pues se observó crecimiento bacteriano a la máxima concentración de compuesto probada.

En el ensayo 3 se evaluó una concentración mayor de cada compuesto, lo que permitió observar inhibición del crecimiento bacteriano con el fragmento **EA**. Esto indica que, a pesar de la baja permeabilidad que ofrece la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, el fragmento es capaz de alcanzar el espacio periplasmático y unirse a la diana celular. Por otro lado, los resultados obtenidos para el conjugado **CSA** en el primer y tercer ensayo no concuerdan, por lo que serán necesarias más réplicas para poder extraer conclusiones. Si bien, no pudo llevarse a cabo un estudio más amplio porque la concentración de compuesto que se necesita para la determinación de CMI's en esta cepa ATCC de *A. baumannii* es elevada y la cantidad de conjugado **CSA** era limitada.

Finalmente, se evaluó la actividad antimicrobiana frente a dos cepas clínicas, con las que se obtuvieron los resultados que se recogen en la Figura 13. Nuevamente, se observó inhibición del crecimiento bacteriano por parte del fragmento **EA** para ambas cepas pero, sin embargo, el conjugado **CSA** no mostró actividad en ninguno de los casos.

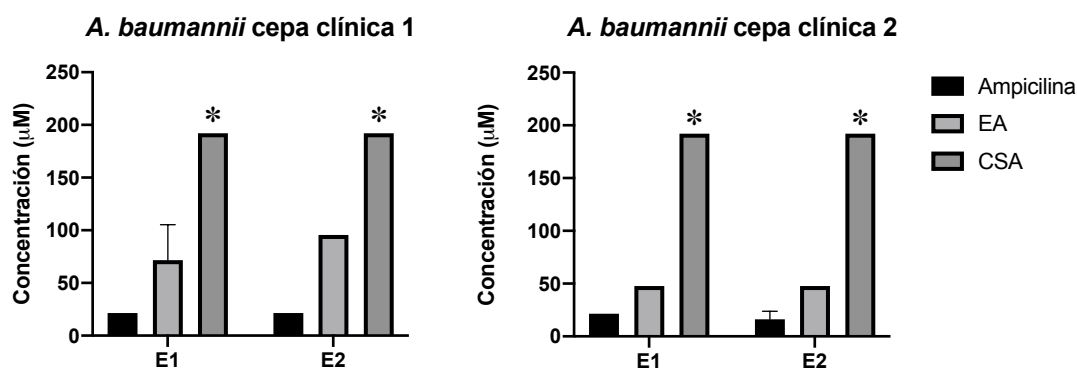


Figura 13. CMI's determinadas para cada uno de los 3 ensayos representadas como promedio y desviación estándar. El asterisco (*) indica que la CMI es igual o mayor al valor representado, pues se observó crecimiento bacteriano a la máxima concentración de compuesto probada.

Por tanto, el conjunto de resultados obtenidos, que se resumen en la Tabla 2, refleja que el fragmento **EA** es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano en 6 de las 10 cepas analizadas, lo que permite concluir que el espaciador no impide la unión de la ampicilina a su diana celular. En cuanto al conjugado **CSA**, aunque desafortunadamente no se consiguió mejorar la actividad de la ampicilina libre, pudo observarse un aumento de la actividad respecto al fragmento **EA** frente a la cepa ATCC de *E. faecalis* que parece indicar la presencia de un mecanismo alternativo a la difusión pasiva. Si bien, serán necesarios más estudios para determinar si es un mecanismo exclusivo de esta cepa y, de ser así, que características genéticas la diferencian.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos con los tres compuestos evaluados frente a las diferentes cepas bacterianas analizadas. "NS" indica que los resultados obtenidos no fueron significativos.

	Ampicilina		EA		CSA	
	mg/L	μM	mg/L	μM	mg/L	μM
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	16	43	128	191	NS	NS
<i>A. baumannii</i> cepa clínica 1	8	21.6	56±16	83.6±23.9	>128	>96
<i>A. baumannii</i> cepa clínica 2	7±2	19±5.4	32	48	>128	>96
<i>A. hydrophila</i> cepa clínica	>16	>43	>16	>24	>16	>12
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	10.8	>16	>24	>16	>12
<i>E. coli</i> TG1	1	2.7	>16	>24	>16	>12
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0.9±0.2	2.4±0.6	16	24	16	12
<i>E. faecalis</i> cepa clínica	1	2.7	32	47.7	>32	>24
<i>E. faecium</i> cepa clínica	32	86	>16	>24	>16	>12
<i>S. aureus</i> ATCC 29231	0.25	0.67	8	12	>16	>12

Con todo, hay que tener en cuenta que los resultados derivados del presente estudio solo pueden ser tomados como una referencia, pues el conjugado sintetizado no se obtuvo en su forma pura. Con una pureza próxima al 100% se espera que la actividad del conjugado **CSA** se incremente.

6. PERSPECTIVAS DE FUTURO

La experiencia adquirida a lo largo del estudio permite plantear mejoras en los ensayos realizados así como nuevas propuestas de cara al futuro, que se resumen a continuación:

- La mayoría de las bacterias resistentes a la ampicilina adquieren resistencia a través de la degradación enzimática medida por β -lactamasas. Esto provoca que el aumento de la concentración intracelular que se pretende alcanzar con el conjugado sea fácilmente neutralizado en las cepas resistentes. Por tanto, se proponen antibióticos que generen resistencias bacterianas principalmente a través de bombas de eflujo, como pueden ser las tetraciclinas. Otra alternativa sería el uso de β -lactámicos difíciles de degradar por β -lactamasas, como carbapenems o cefalosporinas de última generación.
- Para completar los resultados aportados por la determinación de las CMI's sería interesante la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB), que se realiza a partir de la propia placa sin necesidad de consumir más compuesto.
- Los procesos de congelación-descongelación afectaron a la actividad del conjugado, por lo que será conveniente evitarlos en la medida de lo posible en próximos ensayos.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- El fragmento espaciador-ampicilina (**EA**) fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano frente a las tres cepas analizadas de *A. baumannii*, las dos cepas analizadas de *E. faecalis* y la cepa ATCC de *S. aureus*. Por tanto, se puede concluir que la presencia del espaciador no impide la unión de la ampicilina a su diana celular periplasmática.
- La actividad del fragmento espaciador-ampicilina (**EA**) disminuye respecto a la de la ampicilina libre. Esto se explica por la diferencia en el tamaño molecular de ambos compuestos, pues a mayor tamaño molecular más difícil será el transporte por difusión pasiva mediado por porinas. Si bien, además de este efecto también es posible que el espaciador interfiera en la unión de la ampicilina con su diana celular y, por esta razón, serán necesarios más ensayos para evaluar cuál es la contribución de la interferencia en la disminución de la actividad.
- El conjugado sideróforo-antibiótico (**CSA**) solo mostró actividad antimicrobiana frente a la cepa ATCC 29212 de *E. faecalis*, siendo ligeramente superior a la presentada por el fragmento espaciador-ampicilina (**EA**). Esto parece indicar que existe un mecanismo de transporte activo alternativo mediado por el análogo de las amonabactinas que facilita la internalización de la ampicilina mejorando su actividad respecto a la esperada para su peso molecular. Si bien, no se consiguió mejorar la actividad antimicrobiana de la ampicilina libre.

8. CONCLUSIONS

In accordance with the objectives and the results obtained, the following conclusions can be drawn:

- The linker-ampicillin fragment (**EA**) was able to inhibit bacterial growth against the three tested strains of *A. baumannii*, the two tested strains of *E. faecalis* and the ATCC strain of *S. aureus*. Therefore, it can be concluded that the presence of the linker does not prevent ampicillin binding to its periplasmic cellular target.
- The activity of the liker-ampicillin fragment (**EA**) decreases compared to that of free ampicillin. This is explained by the difference in molecular size of the two compounds, as the larger the molecular size, the more difficult the transport by porin-mediated passive diffusion. However, in addition to this effect, it is also possible that the linker interferes with the binding of ampicillin to its cellular target and, for this reason, further research will be necessary to assess the contribution of the interference to the decrease in activity.
- The siderophore-antibiotic conjugate (**CSA**) only showed slightly higher antimicrobial activity against the ATCC 29212 strain of *E. faecalis*, being slightly higher than that presented by the linker-ampicillin fragment (**EA**). This seems to indicate that there is an alternative active transport mechanism mediated by the amonabactin analog that facilitates the internalization of ampicillin, improving its activity with respect to that expected for its molecular weight. However, no improvement in the antimicrobial activity of free ampicillin was achieved.

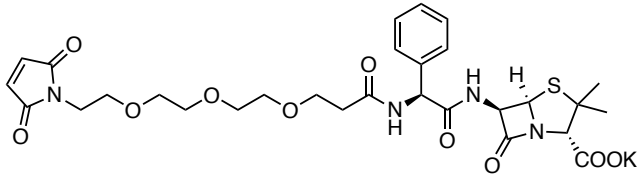
9. BIBLIOGRAFÍA

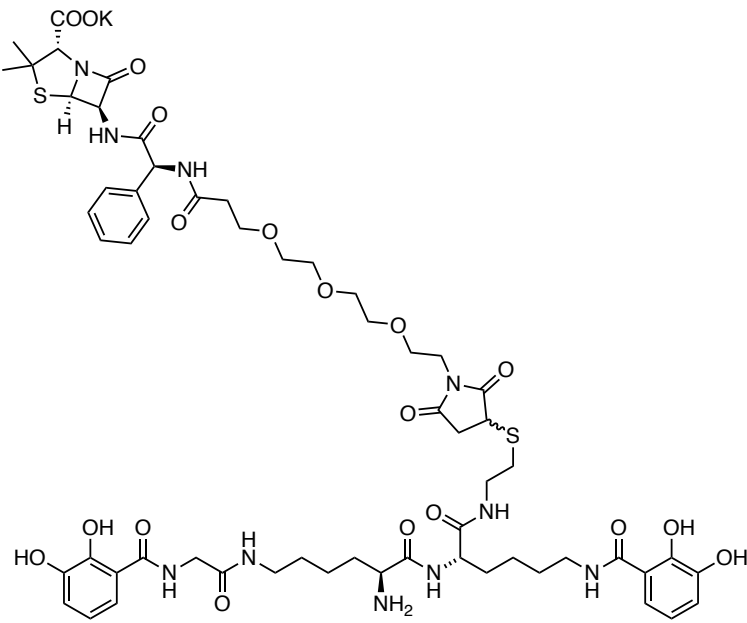
- Cantón, R. *et al.* (2000) ‘Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos’. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas. Editor Picazo JJ. Madrid, pp. 18–33. Disponible en: <https://www.seimc.org>.
- Centola, G., Xue, F. and Wilks, A. (2020) ‘Metallotherapeutics development in the age of iron-clad bacteria’, *Metallomics*, 12(12), pp. 1863–1877. doi: 10.1039/d0mt00206b.
- Chairatana, P., Zheng, T. and Nolan, E. M. (2015) ‘Targeting virulence: salmochelin modification tunes the antibacterial activity spectrum of β -lactams for pathogen-selective killing of *Escherichia coli*’, *Chemical Science*, 6(8), pp. 4458–4471. doi: 10.1039/c5sc00962f.
- Chen, P. H. C. *et al.* (2017) ‘Selective Targeting of Vibrios by Fluorescent Siderophore-Based Probes’, *ACS Chemical Biology*, 12(11), pp. 2720–2724. doi: 10.1021/acscchembio.7b00667.
- Fan, D. and Fang, Q. (2021) ‘Siderophores for medical applications: Imaging, sensors, and therapeutics’, *International Journal of Pharmaceutics*, 597, p. 120306. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120306.
- Fischbach, M. A. and Walsh, C. T. (2006) ‘Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic machinery, and mechanisms’, *Chemical Reviews*, 106(8), pp. 3468–3496. doi: 10.1021/cr0503097.
- Gómez-Garcés, J. L., Aracil, B. and Gil, Y. (2009) ‘Comparación entre dilución en agar y otras 3 técnicas para la determinación de la sensibilidad de 228 aislamientos clínicos de bacilos gramnegativos no fermentadores’, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(6), pp. 331–337. doi: 10.1016/j.eimc.2008.10.003.
- Hackel, M. A. *et al.* (2019) ‘Reproducibility of broth microdilution MICs for the novel siderophore cephalosporin, cefiderocol, determined using iron-depleted cation-adjusted Mueller-Hinton broth’, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 94(4), pp. 321–325. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.03.003.
- Hider, R. C. and Kong, X. (2010) ‘Chemistry and biology of siderophores’, *Natural Product Reports*, 27(5), pp. 637–657. doi: 10.1039/b906679a.
- Kadi, N. and Challis, G. L. (2009) ‘Chapter 17. Siderophore biosynthesis a substrate specificity assay for nonribosomal peptide synthetase-independent siderophore synthetases involving trapping of acyl-adenylate intermediates with hydroxylamine’, *Methods in enzymology*, 458, p. 431–457. doi: 10.1016/s0076-6879(09)04817-4.
- Marín, M. and Gudiol, F. (2003) ‘Antibióticos betalactámicos’, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(1), pp. 42–55. doi: 10.1016/s0213-005x(03)72873-0.
- Mislin, G. L. A. and Schalk, I. J. (2014) ‘Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*’, *Metallomics*, 6(3), pp. 408–420. doi: 10.1039/c3mt00359k.
- NCBI Genomes (2021) *Acinetobacter baumannii* (ID 403). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Acinetobacter+baumannii> (Acceso: 23 agosto 2021).

- NCBI Genomes (2021) *Aeromonas hydrophila* (ID 1422). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Aeromonas+hydrophila> (Acceso: 23 agosto 2021).
- NCBI Genomes (2021) *Enterococcus faecalis* (ID 808). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Enterococcus+faecalis> (Acceso: 23 agosto 2021).
- NCBI Genomes (2021) *Enterococcus faecium* (ID 871). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Enterococcus+faecium> (Acceso: 23 agosto 2021).
- NCBI Genomes (2021) *Escherichia coli* (ID 167). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Escherichia+coli> (Acceso: 23 agosto 2021).
- NCBI Genomes (2021) *Staphylococcus aureus* (ID 154). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Staphylococcus+aureus> (Acceso: 23 agosto 2021).
- Prajapati, J. D., Kleinekathöfer, U. and Winterhalter, M. (2021) ‘How to Enter a Bacterium: Bacterial Porins and the Permeation of Antibiotics’, *Chemical Reviews*, 121(9), pp. 5158–5192. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c01213.
- Rey-Varela, D. *et al.* (2019) ‘The outer membrane protein fstc of aeromonas salmonicida subsp. salmonicida acts as receptor for amonabactin siderophores and displays a wide ligand plasticity. structure-activity relationships of synthetic amonabactin analogues’, *ACS Infectious Diseases*, 5(11), pp. 1936–1951. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00274.
- Sanderson, T. J. *et al.* (2020) ‘A Salmochelin S4-Inspired Ciprofloxacin Trojan Horse Conjugate’, *ACS Infectious Diseases*, 6(9), pp. 2532–2541. doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00568.
- Sargun, A. *et al.* (2021) ‘Enterobactin- And salmochelin- β -lactam conjugates induce cell morphologies consistent with inhibition of penicillin-binding proteins in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073’, *Chemical Science*, 12(11), pp. 4041–4056. doi: 10.1039/d0sc04337k.
- Schalk, I. J. (2008) ‘Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: Specificities and characteristics of the pyoverdine pathway’, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(5–6), pp. 1159–1169. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2007.11.017.
- Skwarecki, A. S., Nowak, M. G. and Milewska, M. J. (2020) ‘Synthetic strategies in construction of organic low molecular-weight carrier-drug conjugates’, *Bioorganic Chemistry*, 104, p. 104311. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104311.
- Southwell, J. W., Black, C. M. and Duhme-Klair, A. K. (2021) ‘Experimental Methods for Evaluating the Bacterial Uptake of Trojan Horse Antibacterials’, *ChemMedChem*, 16(7), pp. 1063–1076. doi: 10.1002/cmdc.202000806.
- Wencewicz, T. A. and Miller, M. J. (2018) ‘Sideromycins as Pathogen-Targeted Antibiotics’, in Fisher, J. F., Mobashery, S., and Miller, M. J. (eds) *Antibacterials: Volume II*. Cham: Springer International Publishing, pp. 151–183. doi: 10.1007/7355_2017_19.
- Wilson, B. R. *et al.* (2016) ‘Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential’, *Trends in Molecular Medicine*, 22(12), pp. 1077–1090. doi: 10.1016/j.molmed.2016.10.005.
- Zheng, T. and Nolan, E. M. (2014) ‘Enterobactin-mediated delivery of β -lactam antibiotics enhances antibacterial activity against pathogenic *escherichia coli*’, *Journal of the American Chemical Society*, 136(27), pp. 9677–9691. doi: 10.1021/ja503911p.

10. ANEXOS

10.1. Características químicas de los compuestos preparados

Fragmento espaciador-ampicilina (EA)			
			
Fórmula molecular	C ₂₉ H ₃₅ N ₄ O ₁₀ SK	Masa exacta	670.1711 g/mol

Conjugado sideróforo-antibiótico (CSA)			
			
Fórmula molecular	C ₅₉ H ₇₇ N ₁₀ O ₁₉ S ₂ K	Masa exacta	1332.4445 g/mol

10.2. Caracterización estructural de los compuestos preparados

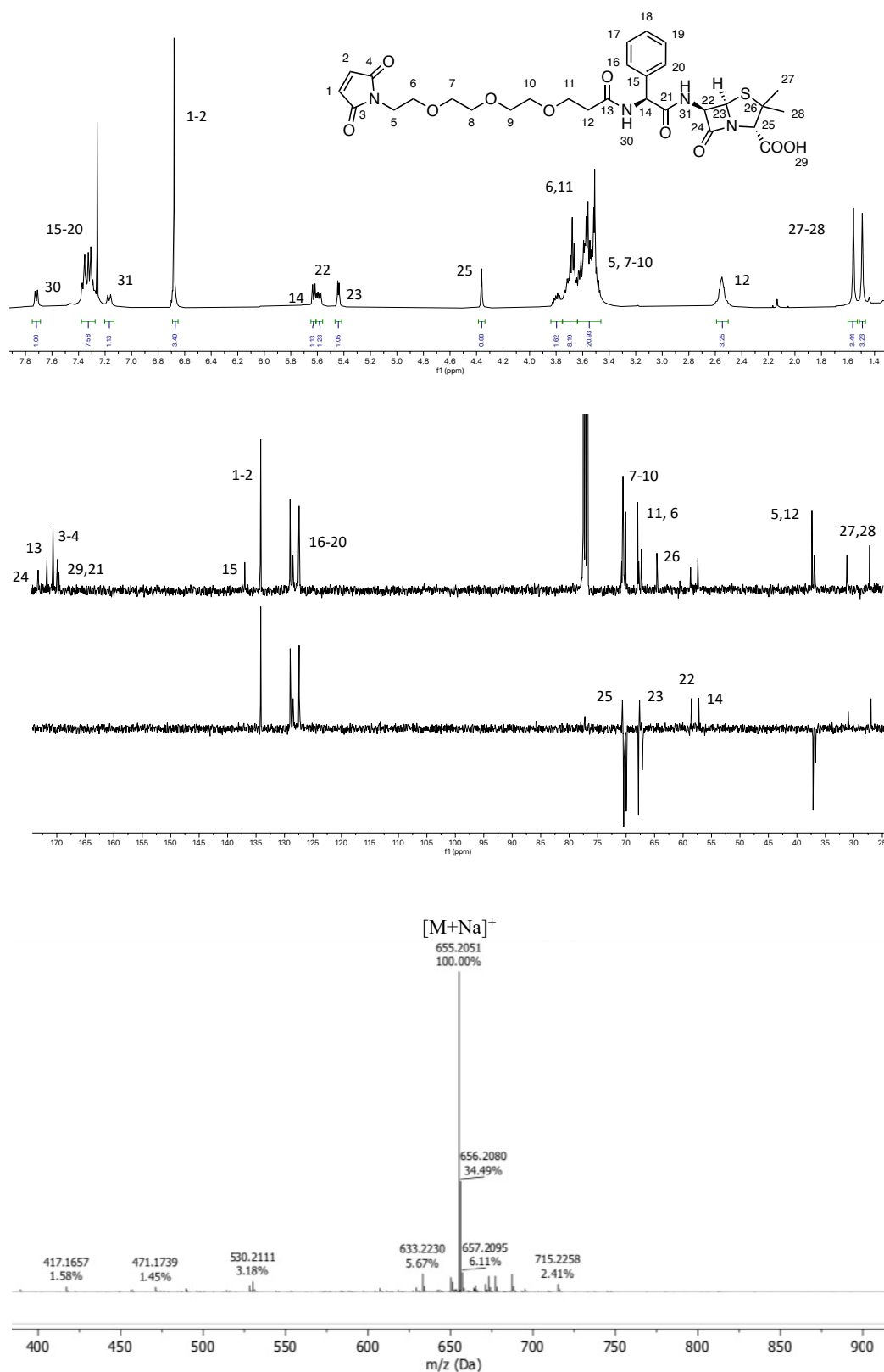


Figura 14. Espectros de RMN-¹H/¹³C, DEPT y ESI-HRMS(+) del fragmento EA.

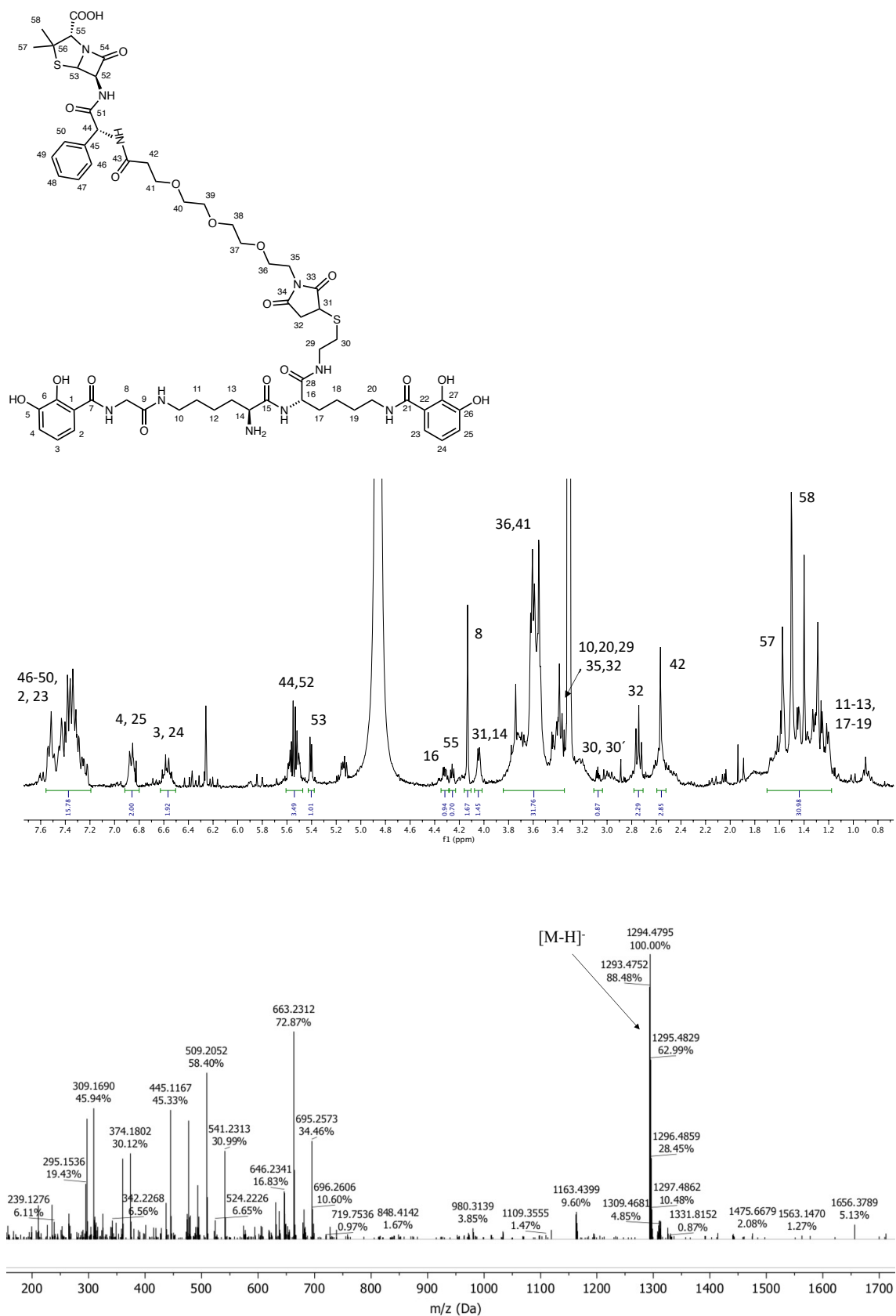


Figura 15. Espectros de RMN- ^1H y ESI-HRMS(-) del conjugado CSA.