



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO

030D BIOQUÍMICA CLÍNICA-MÉDICA E IMMUNOLOGÍA

**MECANISMOS DE CONTROL DE ESTRÉS OXIDATIVO EN
Escherichia coli: DESARROLLO DE ENSAYOS CITÓMICOS
BACTERIANOS BASADOS EN CEPAS MODIFICADAS
GENÉTICAMENTE**

TESIS DOCTORAL

GUADALUPE HERRERA MARTÍN

Director

JOSE ENRIQUE O'CONNOR BLASCO

VALENCIA OCTUBRE 2015



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO

030D BIOQUÍMICA CLÍNICA-MÉDICA E IMMUNOLOGÍA

**MECANISMOS DE CONTROL DE ESTRÉS OXIDATIVO EN
Escherichia coli: DESARROLLO DE ENSAYOS CITÓMICOS
BACTERIANOS BASADOS EN CEPAS MODIFICADAS
GENÉTICAMENTE**

TESIS DOCTORAL

GUADALUPE HERRERA MARTÍN

Director

JOSE ENRIQUE O'CONNOR BLASCO

VALENCIA OCTUBRE 2015

José Enrique O'Connor Blasco, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada " **MECANISMOS DE CONTROL DE ESTRÉS OXIDATIVO EN *Escherichia coli*: DESARROLLO DE ENSAYOS CITÓMICOS BACTERIANOS BASADOS EN CEPAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE**", presentada para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Valencia, ha sido realizada bajo mi dirección por Dña. GUADALUPE HERRERA MARTÍN, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia.

Lo que certifico en Valencia, a 30 de Octubre de 2015.

Fdo. José Enrique O'Connor Blasco

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a dos personas muy importantes en mi carrera científica sin las cuales no hubiera llegado nunca a realizar el trabajo de esta Tesis.

Se trata de mi director de Tesis, el Dr. José Enrique O'Connor, por todo el apoyo que me ha proporcionado a nivel profesional y personal. Hay cosas que nunca se me van a olvidar, gracias Enrique!

En segundo lugar, a mi maestro, el Dr. Manuel Blanco. Cuando entré en su laboratorio de Genética Microbiana del añorado Instituto de Investigaciones Citológicas, era una jovencita de apenas 21 años, con mucha ilusión y pocos conocimientos. El Dr. Blanco, de forma generosa, no sólo me ha mostrado cómo hacer un buen trabajo científico, también me ha enseñado tantas cosas, literatura, filosofía... Muchas gracias!

Un capítulo aparte son mis amigas, y después compañeras, Carmen Navarro y Alicia Martínez. Sin su ayuda en tantos momentos de mi vida, seguro que me habría perdido por el camino.

Agradecer también a Paco, Domingo, Laura, Angie, Sandra y Marta y, en general, a tantos compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y del Centro de Investigación Príncipe Felipe por su ayuda y el apoyo que en ocasiones ha sido incondicional. También a Susana y a Bea por su ayuda.

Por último a mi familia, a mis padres que me inculcaron desde pequeña el amor por el trabajo bien hecho y por la honestidad.

A Fernando mi compañero de viaje. Gracias por aguantar el trabajo tantas veces ingrato y de muchas horas y no desesperar.

A mis hijos Raquel, Hugo, Joaquín, Fernando y a mi Marieta por ser como son cada uno de ellos y recibir siempre más de lo que yo les he podido dar.

*Nada te turbe, nada te espante, todo se pasa, Dios no se muda. La
paciencia todo lo alcanza, quien a Dios tiene nada le falta, sólo Dios basta.*

Santa Teresa de Jesús.

INDICE

INTRODUCCION	7
1. El Oxígeno y Su Toxicidad.....	11
2. Daño Oxidativo y Defensa Antioxidante en <i>E.coli</i>	18
3. Una Nueva Herramienta Para el Estudio de los Procesos Oxidativos en Bacterias: Citometría de Flujo.....	52
OBJETIVOS	68
METODOLOGIA	71
RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL	86
1. Evaluación de <i>Escherichia coli</i> K-12 y <i>Escherichia coli</i> B para el Desarrollo de Ensayos Funcionales por Citometría de Flujo...	88
2. Diseño de un Modelo de Biosensores Bacterianos para Detectar Estrés Oxidativo por Citometría de Flujo Mediante el Uso de Cepas Bacterianas Deficientes en Genes de la Defensa Antioxidante.....	104
3. Aplicación del Modelo de Biosensores Bacterianos para Estudios de Toxicidad Oxidativa Ligada a la Estructura Química de los Compuestos.....	130
4. Extrapolación del Modelo de Biosensores Bacterianos para Estudios de Toxicidad Oxidativa en Humanos.....	137
CONCLUSIONES	158
BIBLIOGRAFIA	161

Abreviaturas

CMF Citometría de flujo

DCDHF-DA Dihidrodiclorofluoresceína diacetato

DHE Dihidroetidina

DHR123 Dihidrorodamina 123

EB Bromuro de etidio

FCCP Carbonyl cyanide 4 (trifluorometoxy) phenilhidrazone

FITC Fluorescein isothiocyanate

HE Hidroetidina

HgOr Naranja de mercurio

MEL Melatonina

PI Yoduro de propidio

RH123 Rodamina 123

ROS Especies reactivas de oxígeno

RNS Especies reactivas de nitrógeno

SIN-1 3- Morpholinosydnonimine hydrochoride

INTRODUCCIÓN

1. EL OXÍGENO Y SU TOXICIDAD

La vida en la Tierra ha evolucionado creando organismos que necesitan del oxígeno (O_2) para vivir. La mayor parte de los seres vivos depende del O_2 para obtener grandes cantidades de energía metabólica a partir de la oxidación de biomoléculas. El consumo mayoritario de O_2 se dirige a la fosforilación oxidativa, aunque otras reacciones minoritarias de hidroxilación y oxigenación utilizan O_2 para incorporarlo directamente a los sustratos bioquímicos sin que se produzca energía. Sin embargo, una gran paradoja del O_2 radica en que las funciones del O_2 esenciales para los seres vivos dependen de una propiedad química peligrosa para ellos: la estructura de la molécula de O_2 tiene dos electrones desapareados y el O_2 molecular puede aceptar electrones individuales para generar formas moleculares muy inestables y altamente reactivas, conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species). Si se contempla el concepto de radical libre como el de cualquier especie molecular que contenga uno o más electrones desapareados (Halliwell *et al* 2004), se entiende que la propia molécula de O_2 en realidad, es un bi-radical libre.

El término ROS debe aplicarse a una variedad de moléculas no sólo derivadas del O_2 y que incluye tanto a los radicales libres como a especies derivadas de los radicales libres. Existen además numerosos radicales libres y moléculas reactivas que contienen nitrógeno, las especies reactivas de nitrógeno (RNS, Reactive Nitrogen Species). Debido a que contienen también oxígeno y su generación está ligada a la de las ROS, frecuentemente se consideran como ROS (Hermes

Lima *et al* 2004; Droge 2002). En la Tabla 1 se muestran de forma resumida las principales ROS.

Tabla 1. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO, CLORO Y NITRÓGENO (Adaptado de Halliwell <i>et al</i> , 2004)			
Especies reactivas de oxígeno (ROS)			
Radical		No radical	
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Hidroxil	OH^{\cdot}	Ácido hipobromoso	$BrOH$
Hidroperoxil	HO^{\cdot}	Ácido hipocloroso	$ClOH$
		Ozono	O_3
Peroxil	$RO_2^{\cdot-}$	Oxígeno singlete	O^1_2
Alcoxil	RO^{\cdot}	Peróxidos orgánicos	$ROOH$
Carbonato	$CO_3^{\cdot-}$	Peroxinitrito	$NOOO^{\cdot-}$
Especies reactivas de cloro (RCS)			
Cloro atómico	Cl^{\cdot}	Ácido hipocloroso	$ClOH$
		Cloruro de nitrilo	$ClNO_2$
		Cloraminas	
		Cloro gas	Cl_2
Especies reactivas de nitrógeno (RNS)			
Óxido nítrico	NO^{\cdot}	Ácido nitroso	NO_2H
Dioxido de nitrógeno	$NO_2^{\cdot-}$	Catión nitroso	NO_2^+
		Anión nitroso	$NO^{\cdot-}$
		Tetraóxido dinitrógeno	O_4N_2
		Ácido peroxinitroso	$ONOOH$
		Alquilperoxinitritos	$ROONO$

La generación de radicales libres y ROS puede ser endógena, asociada a procesos oxidativos, como la cadena mitocondrial de transporte electrónico, NADPH oxidasa, Xantina oxidasa y diversas flavoproteínas) o exógena, derivada de patologías inflamatorias, exposición a xenobióticos, radiación ionizante, etc.

En los organismos superiores, la principal generación de ROS tiene lugar en la mitocondria, durante la reducción tetravalente de O_2 que se produce en la cadena de transporte de electrones asociada a la fosforilación oxidativa. En las células procariotas, este mecanismo tiene lugar en la membrana plasmática.

Este proceso, dirigido a la producción de ATP, da lugar a H_2O como producto final, pero esta reducción completa no se consigue directamente, sino que se produce una secuencia de reducciones univalentes que generan ROS (Figura 1).

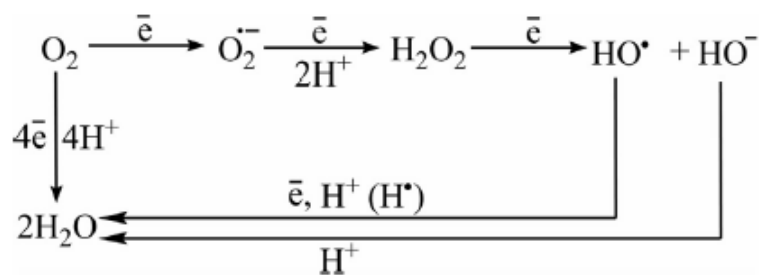


Figura 1. Esquema de la secuencia de reducción del oxígeno molecular.

En esta serie de reducciones parciales se producen directa o indirectamente anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\bullet}), especies que, en determinadas condiciones son las responsables de la toxicidad del O_2 . La incorporación de un

electrón a la molécula de oxígeno da lugar al $O_2^{\bullet-}$, que es un radical poco reactivo, pero que puede oxidar tioles y al ácido ascórbico. El $O_2^{\bullet-}$ da lugar a H_2O_2 , mediante una reacción espontánea o catalizada por la acción del enzima superóxido dismutasa. H_2O_2 puede reaccionar con diferentes compuestos orgánicos y en presencia de metales como Fe^{++} o Cu^{++} se transforma en radical OH^{\bullet} , una especie muy reactiva.

La interacción de diversos ROS con derivados del nitrógeno puede generar otras especies reactivas. El óxido nítrico (NO), un gas que se sintetiza en muchos tipos de células a partir de L-arginina mediante distintas isoformas del enzima NO sintetasa, es un reductor débil, reacciona con O_2 para formar NO_2 , pero reacciona muy rápidamente con el $O_2^{\bullet-}$ para producir peroxinitrito ($ONOO^-$), un poderoso oxidante que puede causar depleción de grupos tiol, fragmentación del ADN y nitración de proteínas.

Para prevenir los efectos lesivos de la producción in vivo de ROS y radicales libres, la evolución ha dotado a los organismos superiores de sistemas antioxidantes complejos y eficaces que incluyen mecanismos antioxidantes enzimáticos y moléculas antioxidantes, entendidas en sentido amplio como aquellas moléculas que protegen a una diana biológica frente al estrés oxidativo (Halliwell, 2004).

El primero de los enzimas antioxidantes es la superóxido dismutasa (SOD) que inicia la defensa frente a ROS con la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . A continuación, los enzimas catalasa y glutatión (GSH) peroxidasa, transforman H_2O_2 en H_2O . En el proceso de la GSH peroxidasa se consume por oxidación el GSH, principal antioxidante

soluble, por lo que la GSH reductasa transforma el GSH oxidado (GSSG) en GSH reducido. (Figura 2)

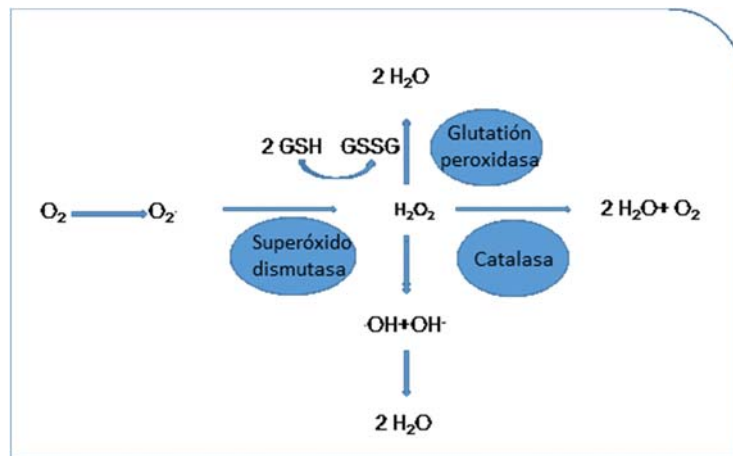


Figura 2. Esquema de los principales sistemas antioxidantes enzimáticos.

Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentra un extenso conjunto de moléculas que ejercen diversos mecanismos protectores antioxidantes, incluyendo moléculas que reaccionan con ROS, como el GSH, los tocoferoles y el β caroteno, o proteínas como transferrina y ceruloplasmina, capaces de quelar diferentes metales de transición (Fe^{++} o Cu^{++}). Hay que destacar que muchos de los antioxidantes son moléculas procedentes de la dieta, como Vitaminas (vitamina E, vitamina C) y cofactores (Se, Zn, Mn) y muchos compuestos naturales como carotenoides y polifenoles.

A pesar de la poderosa y compleja maquinaria antioxidante de los organismos superiores, cuando la capacidad de estos mecanismos protectores es superada por la intensidad o duración de las agresiones oxidativas, se produce una situación denominada estrés oxidativo, que

se define como una alteración en el equilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes, produciendo un daño oxidativo (Halliwell 2004). El estrés oxidativo puede resultar de dos procesos distintos, pero no excluyentes. Por una parte, la disminución de los niveles o la actividad de enzimas de la defensa antioxidante por mutación o por destrucción del centro activo, inducida por las propias ROS. Las deficiencias en el aporte dietario de antioxidantes solubles también pueden causar estrés oxidativo. Por otra parte, el incremento de la producción de ROS, la exposición de células u organismos a niveles elevados de ROS exógenos o sus precursores metabólicos, e incluso la inducción excesiva de sistemas protectores (inmunológicos, detoxificantes) que producen ROS pueden conducir a la situación de estrés oxidativo.

El daño oxidativo, definido como el daño a las células y tejidos producido por ROS, está asociado a reacciones en cadena de los radicales libres con todo tipo de moléculas celulares, como carbohidratos, lípidos, proteínas y ADN. Este daño se asocia a muchas patologías importantes, que incluyen pero no se limitan a la isquemia, aterosclerosis, procesos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes y enfermedades de la mucosa intestinal (Battacharyya *et al* 2014; Li *et al* 2014; Henschcliffe *et al* 2008; Barnham *et al* 2004)

A la vista de la complejidad de los mecanismos bioquímicos mencionados y de la relevancia del daño oxidativo en la patología humana, es evidente el interés que reviste el estudio del estrés oxidativo en sistemas biológicos simples, como las bacterias, en los

que los sistemas de regulación de la respuesta antioxidante están muy bien caracterizados. Esta aproximación puede ser útil para mejorar el conocimiento de los mecanismos de estrés oxidativo en sistemas más complejos e, incluso, poder identificar nuevas dianas terapéuticas o ensayos funcionales de aplicación a la patología oxidativa humana.

2. DAÑO OXIDATIVO Y DEFENSA ANTIOXIDANTE EN *Escherichia coli*

La presencia del O₂ en una atmósfera anaerobia surgió a través de la aparición del agua, produciéndose una serie de cambios en el metabolismo de los organismos así como un aumento en la presión de selección frente a esta atmósfera cambiante. El O₂ desarrolla la fotosíntesis, capacitando a los organismos que la producen a sintetizar compuestos orgánicos a partir de inorgánicos, aumenta el rendimiento energético de los nutrientes mediante la fosforilación oxidativa, surgen nuevas transformaciones metabólicas capaces de detoxificar compuestos nocivos para las células, incluso aparece la posibilidad de generar calor y luz. El oxígeno aumenta la tasa de mutación, acelerándose el proceso evolutivo, aunque se permite la supervivencia tanto de los organismos capaces de manejar el oxígeno como de aquellos que no pueden hacerlo. Los organismos aerobios pueden aprovechar los beneficios metabólicos que aporta el oxígeno, aunque ello les ha supuesto el desarrollo de una serie de sistemas de defensa frente a los efectos adversos del oxígeno; en cambio, los organismos anaerobios no han desarrollado estos mecanismos defensivos y su evolución queda limitada a microorganismos que viven en nichos anerobios.

La toxicidad del O₂ se puso de manifiesto cuando microorganismos anaerobios sometidos a una atmósfera con oxígeno o microorganismos aerobios en condiciones de hiperoxia eran incapaces de crecer, incluso morían. El descubrimiento de actividades enzimáticas capaces de eliminar especies derivadas del oxígeno, junto al hecho de que estuviesen presentes en organismos aerobios y

fueran escasas en anaerobios, llevó a pensar que estas especies eran subproductos del metabolismo aerobio normal y que si no eran eliminadas podrían ser tóxicas para las células. De aquí surge la hipótesis sobre la toxicidad del oxígeno y del concepto de estrés oxidativo. En el metabolismo oxidativo celular se forman subproductos derivados del oxígeno, las especies reactivas del oxígeno (ROS), que pueden reaccionar con gran variedad de macromoléculas y estructuras celulares, induciendo modificaciones que interfieren en el crecimiento normal de la célula, incluso pueden llevar a su muerte; frente a estos compuestos nocivos la célula dispone de un sistema de defensa antioxidante, formado por enzimas y pequeñas moléculas, capaz de prevenir su formación y de eliminarlos, evitando así los efectos adversos que se podrían producir. En este contexto, el estrés oxidativo se genera cuando la formación de ROS supera a la capacidad del sistema de defensa antioxidante celular para eliminarlas. El estrés oxidativo no sólo se genera de forma endógena, sino también se puede generar exógenamente cuando la célula se somete a estímulos externos, que pueden provocar la formación de ROS a nivel intracelular.

2.1 Especies reactivas del oxígeno (ROS) en *E. coli*

El oxígeno molecular o dioxígeno (O_2) tiene una estructura molecular con unas características especiales en cuanto a su reactividad en los sistemas biológicos. Debido a sus características electrónicas es más propenso a ceder electrones de forma univalente. Además, el potencial de reducción del O_2 (-0.16 V) hace que sea un aceptor de electrones univalente débil. Así, el O_2 en un sistema biológico donde la

mayoría de las moléculas orgánicas son dadores de electrones univalentes débiles, no tiene capacidad para oxidar eficientemente la mayoría de los componentes celulares, como aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos (Imlay 2003)

La reducción univalente del oxígeno genera especies reactivas intermediarias, son las llamadas ROS. Las principales ROS que se pueden encontrar en los organismos aerobios son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO\cdot$). Únicamente se consideran radicales libres el superóxido y el hidroxilo, ya que junto con el oxígeno son las únicas especies que tienen un electrón desapareado; de hecho, el oxígeno se considera como un diradical, ya que tiene dos electrones desapareados, aunque dada su baja eficacia como aceptor de electrones univalente no se considera igual de reactivo que sus especies intermediarias. El peróxido de hidrógeno a pesar de no tener electrones desapareados, se considera especie reactiva porque es capaz de reaccionar con moléculas orgánicas, incluso puede generar, a través de diferentes reacciones químicas, radicales libres. En cualquier caso, todas estas ROS tienen mayor capacidad que el oxígeno de aceptar electrones de manera univalente debido a sus potenciales de reducción (+0.94 V, +0.38 V y +2.33 V para el $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 y el $OH\cdot$, respectivamente) (Imlay 2003)

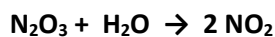
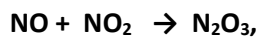
Una vez formadas, estas ROS tienen diferente facilidad para reaccionar con las distintas estructuras celulares. Mientras el superóxido es poco efectivo como oxidante de especies ricas en electrones, debido a su carga eléctrica negativa, la reactividad del peróxido de hidrógeno disminuye debido a la estabilidad de su enlace oxígeno-oxígeno. La

importancia del H_2O_2 deriva de su capacidad para generar el intermediario más reactivo, el radical hidroxilo, que reacciona incluso a velocidades limitadas por la difusión con la mayoría de las biomoléculas

2.2 Especies reactivas del nitrógeno (RNS) en *E. coli*

El óxido nítrico (NO) es un radical estable. Por esta razón, al igual que ocurre con el O_2 , el NO tiene poca capacidad para interaccionar con la mayoría de la biomoléculas. Es una molécula liposoluble, por tanto, capaz de atravesar las membranas celulares y con una vida media muy corta.

El NO es oxidado a NO_2 por el O_2 , reaccionando con el NO en solución acuosa para dar nitrito (NO_2^-) exclusivamente, a través de la formación de N_2O_3 :



La reducción y la oxidación del NO generan el anión nitroxil (NO^-) y el catión nitrosil (NO^+), respectivamente. La reacción del NO con el O_2^- , así como la del NO^- con el O_2 , da lugar a la formación de peroxinitrito, el cual se descompone en nitrato (NO_3) como producto principal, aunque también puede dar lugar a la formación del ión hidroxilo y el radical dióxido de nitrógeno (NO_2^\cdot).

El NO puede reaccionar con tioles, siendo el glutatión (GSH) el más importante, dando lugar a nitrosotioles como el nitrosoglutatión (GSNO). Estos compuestos pueden dar lugar a la liberación de NO^+ ,

aunque en determinadas condiciones también pueden funcionar como dadores de NO.

2.3 Fuentes celulares de especies reactivas del oxígeno en *E. coli*.

Los microorganismos generan $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en condiciones normales si crecen en un ambiente con oxígeno, a través de la reducción univalente del O_2 .

La mayoría de los transportadores de electrones que se encuentran en los sistemas biológicos, como NAD(P)H, se resisten a la pérdida de un único electrón; esto, junto al bajo potencial de reducción del par $O_2/O_2^{\cdot-}$, hace que la mayoría del tráfico de electrones no se vea afectado por la presencia del oxígeno.

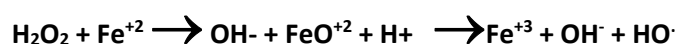
Otros transportadores como las flavinas, quinonas y los centros metálicos permiten la reducción univalente del oxígeno con relativa facilidad. Las flavinas que se encuentran en forma libre pueden participar en la formación de estos intermediarios reactivos; por otro lado, las flavinas, quinonas y grupos metálicos que constituyen el grupo prostético de algunas proteínas también tienen capacidad para ceder electrones al O_2 de forma univalente.

La cadena respiratoria, donde los principales grupos prostéticos implicados en el flujo electrónico son las flavinas, quinonas, centros hemo y complejos hierro-azufre, podría ser una de las principales fuentes endógenas de H_2O_2 . Las flavinas son grupos que aceptan átomos de hidrógeno de diferentes sustratos reductores y los ceden electrones, a través de complejos hierro-azufre, a las quinonas que se encuentran embebidas en la membrana donde se transfieren a los

citocromos y finalmente al oxígeno, formándose H₂O como producto final y generándose un gradiente electroquímico utilizado por la célula para sintetizar ATP.

Los radicales libres superóxido y peróxido de hidrógeno se generan en la cadena respiratoria al oxidarse las deshidrogenasas, la NADH deshidrogenasa II, la FDR y las flavinas libres (Messner *et al* 2002). Sin embargo, los niveles de ROS generados intracelularmente son inferiores a los que se han detectado *in vitro*. Por tanto, la cadena respiratoria parece no ser la principal fuente endógena de H₂O₂ en *E. coli*, desconociéndose hasta el momento cuál podría serlo (Imlay 2003).

Otra especie reactiva del oxígeno es el radical hidroxilo, el único radical libre que interacciona con la mayoría de las biomoléculas. Se forma a partir de la reacción del peróxido de hidrógeno con el hierro en estado ferroso a través de la reacción de Fenton:



Para que esta formación se produzca en la célula es necesaria una fuente de H₂O₂, endógena o exógena, y una reserva importante de Fe⁺², ya que de otro modo la reacción sería poco eficiente debido al rápido consumo de uno de los sustratos. El hierro como sustrato de la formación del radical hidroxilo es el que se encuentra en el citosol y el que está unido a biomoléculas, como proteínas, membranas celulares y DNA; en cambio, el que forma parte de las metaloproteínas no estaría en principio disponible para participar en esta reacción. La rápida reactividad del peróxido de hidrógeno *in vivo* indica que debe

existir un reductor intracelular capaz de regenerar el Fe^{+2} a partir del Fe^{+3} , es decir, que el hierro catalizaría la cesión desde un sustrato reductor al H_2O_2 . El superóxido, sin embargo, parece tener un papel importante en la consecución del radical hidroxilo, ya que es capaz de interactuar con los centros hierro-azufre de proteínas como las deshidratasa y de enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), provocando la liberación de hierro de estos centros y, por tanto, catalizando la producción del radical (Imlay 2003)

2.4 Daño celular inducido por ROS

Los radicales libres son capaces de interactuar con los componentes celulares como proteínas, lípidos y ADN. Por un lado, se producen interacciones que dañan estos componentes comprometiendo la viabilidad celular; por otro lado, estas interacciones están implicadas en procesos de señalización celular, generándose respuestas frente a estímulos intra o extracelulares.

2.4.1 Modificación de proteínas

Los radicales libres interactúan con las proteínas en diferentes partes de la estructura de éstas. Las modificaciones que producen se pueden clasificar en dos grandes grupos, según la parte de su estructura que es afectada: los radicales libres actúan sobre la parte proteica interactuando con los aminoácidos que constituyen la estructura primaria induciendo cambios en su estructura secundaria y terciaria y la interacción se puede producir también a nivel del grupo prostético, a través de diversas reacciones con diferentes componentes que forman parte de estos grupos.

La oxidación de proteínas tiene un papel importante en muchos de los efectos del estrés oxidativo y nitrosativo. Estas reacciones de oxidación pueden producir una serie de cambios, dependiendo de las especies reactivas y de los aminoácidos implicados. Las modificaciones producidas pueden ser irreversibles, como la carbonilación de la lisina (Lys) y de la arginina (Arg), la formación de enlaces di-tirosina (diTyr), los enlaces proteína-proteína y la nitración de la Tyr y el triptófano (Trp); estos cambios generalmente producen la pérdida de función permanente de las proteínas dañadas que se degradan posteriormente o se acumulan en el citoplasma. Por otro lado, algunas oxidaciones tienen carácter reversible, como la oxidación o la nitrosación de los grupos tiol, y tienen un papel en la regulación redox celular (Ghezzi *et al* 2003)

Las modificaciones más importantes desde el punto de vista de la regulación redox celular son la oxidación/reducción de tioles y la formación de enlaces disulfuro.

2.4.2 Oxidación/reducción de tioles

Los tioles pueden ser oxidados por el H_2O_2 irreversiblemente a ácido sulfínico (P-SO₂H) o cisteico (P-SO₃H), provocando la pérdida de función de la proteína. Por otro lado, se producen oxidaciones de tioles reversibles, como la formación de nitrosotioles (P-SNO), ácidos sulfénicos (P-SOH), radicales tiil (P-S-) y enlaces disulfuro (P-SS-P) intermoleculares, intramoleculares o mixtos, que no producen pérdida de función y están implicadas en la regulación redox celular (Ritz *et al* 2001).

Se produce la reacción del superóxido con uno de los tioles libres más abundantes, el glutatión (GSH). Ésta es una reacción en cadena donde se regenera el superóxido, siendo necesaria la intervención de la superóxido dismutasa; por tanto, la acción conjunta del GSSH y la superóxido dismutasa se propone como un buen sistema antioxidante celular, ya que el GSH reacciona con varios radicales libres, y la SOD elimina el superóxido generado (Winterbourn *et al* 1994).

2.4.3 Enlaces disulfuro

Una de las principales vías de regulación redox está mediado por la formación o reducción de disulfuros, incluyendo disulfuros mixtos (entre proteínas y tioles libres) con tioles de bajo peso molecular, concretamente el glutatión (GSH) o la Cys. La formación de estos disulfuros mixtos se puede producir por la oxidación del grupo sulfidril mediada por un oxidante o por un intercambio disulfuro-tiol, además también a través de la reacción con el óxido nítrico, incluyendo la formación del nitrosoglutatión (GSNO), y de los radicales tiol. Debido a que el ambiente celular está altamente reducido, la mayoría de las proteínas citoplásmicas son ricas en grupos tiol libres, que son reguladas a través de la oxidación/reducción de estos grupos. Un gran número de estas proteínas están implicadas en la transducción de señal o en la regulación de la expresión génica, enzimas y proteínas del citoesqueleto. La reducción de los enlaces disulfuro, regenerando así los grupos tiol, en *E.coli* se produce a través de los enzimas tiorredoxina y glutarredoxina.

2.4.4 Peroxidación lipídica de membranas

La peroxidación lipídica es un proceso que se produce en tres fases: iniciación, propagación y terminación. La fase de iniciación implica la reacción de los radicales libres con los lípidos celulares, generándose radicales peroxilo, en la fase de propagación se produce la reacción de estos radicales peroxil recién formados con lípidos intactos, generándose una reacción en cadena que termina por la acción de un antioxidante que bloquea esta cadena de reacciones. Es un fenómeno perjudicial para la célula, ya que se pueden producir cambios en las propiedades físico-químicas de la membrana, como su fluidez, así como la inactividad de transportadores y enzimas que forman parte de la membrana plasmática.

Se ha propuesto que la reacción de propagación sólo es cinéticamente eficiente en lípidos poliinsaturados, ausentes en la composición lipídica de la membrana de *E.coli*. Por tanto, existen dudas acerca de la peroxidación lipídica de las membranas en *E. coli* (Imlay *et al* 2003, Bielski 1983).

2.4.5 Lesiones oxidativas en el ADN

Las células protegen al ADN del efecto lesivo de las especies reactivas (ROS, RNS). Han desarrollado un sistema de reparación de las lesiones inducidas por estrés oxidativo y nitrosativo capaz de eliminarlas, con el fin de evitar los efectos perjudiciales que se pueden derivar para la célula (Demple *et al* 1994).

Se han identificado más de 100 modificaciones del ADN inducidas por ROS, bien sea en las bases o en la desoxirribosa. El ión hidroxilo parece ser el principal causante de estas lesiones, efecto que se ve facilitado

por el carácter polianiónico del enlace fosfodiéster, ya que se produce una atracción por parte de éste de metales como el Fe^{2+} , favoreciendo la reacción de Fenton. El NO y sus derivados tienen capacidad para inducir lesiones en el ADN, principalmente a través de la deaminación de bases, aunque hay otros procesos implicados (Gros *et al* 2002).

Las lesiones generadas por radicales libres sobre el ADN se pueden clasificar en tres grandes grupos: lesiones en las bases del ADN, lesiones en la desoxirribosa del ADN y reacciones de entrecruzamiento entre nucleótidos (Demple *et al* 1994).

2.4.5.1 Lesiones en las bases del ADN.

Las modificaciones en las bases producidas por ROS pueden ser mutagénica, si hay un apareamiento incorrecto de las bases o citotóxicas si se produce un bloqueo en la replicación.

Una de las más comunes es la timina glicol producida a través de la oxidación de la timina dando lugar a la 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina. La timina glicol sufre descomposición catalizada por bases generándose productos de fragmentación, que dan lugar a residuos de urea ligados a la desoxirribosa. Estas lesiones bloquean la replicación, aunque son levemente mutagénicas. Otra modificación que sufre la timina es la oxidación de su grupo metil exocíclico dando lugar a la 5-hidroxitimina.

La oxidación de la citosina también da lugar a la 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrocitosina. Los citosina glicol así formados sufren una reacción secundaria, la deaminación, provocando la formación de uracilo que forma pares de bases preferentemente con la adenina en lugar de con

la guanina, aumentando así la capacidad mutagénica de esta modificación.

Las purinas pueden sufrir reacciones de oxidación que generan diferentes productos. Por un lado, la oxidación de la guanina da lugar a la 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-hidroxiguanina, 8oxoG), un importante marcador del daño oxidativo al ADN y con elevada capacidad mutagénica, mientras que la de la adenina para formar 8-oxoadenina es menos relevante desde el punto de vista de los efectos biológicos que puede producir. Las purinas fragmentadas provocan la formación de residuos de formamidopirimidina, capaces de bloquear la replicación del ADN.

Por otro lado, el NO en presencia de O₂ es capaz de producir la deaminación de purinas y pirimidinas, a través de la nitrosación provocada por N₂O₃ (producto de la reacción del NO con el O₂). Estas lesiones son mutagénicas, ya que la deaminación provoca la conversión de citosina a uracilo, la metilcitosina a timina, la guanina a xantina y la adenina a hipoxantina. Además, el peroxinitrito generado por la reacción del NO con el superóxido, puede producir la oxidación de la guanina dando lugar a 8-oxoG o su nitración formando los aductos 8-nitroguanina.

2.4.5.2 Lesiones en la desoxirribosa del ADN

El enlace fosfodiéster está expuesto al solvente, siendo susceptible del ataque por los radicales libres. Además, debido a sus características eléctricas tiene afinidad por los metales como el Fe²⁺, facilitando la formación de radical hidroxilo a partir del H₂O₂ en sus proximidades.

Las modificaciones a este nivel pueden desplazar bases, rompiendo el enlace glicosídico que une la base al azúcar.

El desplazamiento de bases puede dar lugar a la formación de sitios abásicos (apurínicos y apirimidínicos, llamados sitios AP), que pueden ser mutagénicos, ya que durante la replicación se añade preferentemente una adenina cuando la ADN polimerasa encuentra un sitio AP (regla A) o pueden producir roturas de simple cadena. La fragmentación de la desoxirribosa produce roturas de simple cadena del ADN. El radical hidroxilo parece el principal responsable de estas lesiones, aunque el peroxinitrito puede provocar también este tipo de modificaciones.

2.4.5.3 Reacciones de entrecruzamiento

Se pueden producir reacciones de entrecruzamiento entre diferentes cadenas del ADN, aunque es poco frecuente. Los entrecruzamientos entre nucleótidos de la misma cadena pueden ser citotóxicos o mutagénicos, siendo el caso mejor conocido la formación de dímeros de pirimidina.

2.5 Sistema de defensa antioxidante en *Escherichia coli*: Mecanismos y regulación génica.

La formación de ROS y NOS es importante para la célula, ya que estas especies actúan como segundos mensajeros desencadenando diferentes respuestas celulares. Sólo cuando alcanzan una concentración suficiente para dañar a la célula se inducen una serie de respuestas altamente reguladas, cuya finalidad es la eliminación de las especies tóxicas y la reparación o recuperación de las estructuras

celulares dañadas. El sistema de defensa frente al estrés oxidativo en *E.coli* está organizado en tres regulones principales. Estos regulones son *oxyR*, *soxRS* y *fur*. La inducción de estos sistemas no se produce de forma aislada y sin interferencias entre ellos, ya que hay especies reactivas que afectan a más de un regulón, o especies cuya interacción con diferentes componentes celulares puede dar lugar a otras especies que inducen otro regulón, incluso se puede dar el caso que una misma función sea diana de más de un sistema de regulación.

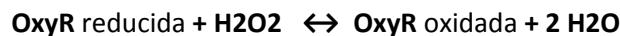
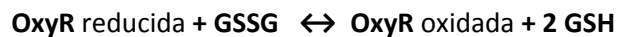
2.5.1 OxyR protege frente al H₂O₂ y al NO

OxyR es una proteína de 34KDa que forma un homotetrámero (Kullik *et al* 1995), es homóloga de la familia de reguladores transcripcionales LysR de *E.coli* (Christman *et al* 1989, Toledano *et al* 1994). OxyR regula negativamente la expresión de su propio gen *oxyR* y regula positivamente a un gen adyacente codificando para un RNA, *oxyS* (Altuvia *et al* 1997). OxyR controla hasta 40 genes que protege a la célula de la toxicidad de peróxido de hidrógeno. Mutantes en el gen *oxyR* son hipersensibles al H₂O₂ y mutantes que expresan constitutivamente altos niveles de OxyR son resistentes a la acción de H₂O₂ (Christman *et al* 1985). OxyR tiene función en la protección frente al estrés térmico (Christman *et al* 1985), UV (Kramer *et al* 1987), singlet oxígeno (Kim *et al* 2002) peroxidación lipídica (Yoon *et al* 2002) y muerte por neutrófilos (Staudinger *et al* 2002).

La inducción transcripcional de los promotores a los que regula sucede cuando OxyR pasa de su estado reducido a su estado oxidado. En este estado OxyR reconoce 4 bases ATAG separadas por 10 pares de bases en el promotor. En presencia de H₂O₂ el residuo de cisteína Cys199 se

oxida a ácido sulfénico y forma una unión disulfuro con la cisteína Cys208 (Zheng *et al* 1998). Como resultado la forma reducida y oxidada de la proteína tienen estructuras diferentes (Choi *et al* 2001). La forma oxidada se une a la RNA polimerasa para regular positivamente los promotores del regulon OxyR, mientras que la forma reducida de OxyR regula negativamente otros genes.

La inactivación del factor transcripcional OxyR se produce por la reducción de los puentes disulfuro a través del sistema glutarredoxina/glutation/glutation reductasa. Este sistema forma parte de un complejo sistema de actividades enzimáticas acopladas con diferentes reductores celulares, el sistema tiorredoxina y el sistema glutarredoxina, cuya actividad es la recuperación de los grupos sulfidril (-SH) presentes en muchas proteínas celulares y que son esenciales para su función (Zheng *et al* 1998).



El estudio del perfil transcripcional basado en tecnología por microarrays detecta la inducción de 140 ARN mensajeros tras la inducción con peróxido de hidrógeno. La inducción de estos genes está mediada no sólo por OxyR sino también por el sistema SoxRS, además de otras vías reguladoras redox todavía desconocidas (Zheng *et al* 2001). Los genes que regula OxyR mejor conocidos codifican para diferentes proteínas implicadas en la defensa antioxidante celular. Estos genes incluyen *katG* (catalasa-hidroperoxidasa I), *ahpCF* (peroxirredoxina alquil hidroperóxido reductasa), *oxyS* (un pequeño

ARN regulador), *dps* (codifica para una proteína de unión al ADN inespecífica), *gorA* (glutathion reductasa), *grxA* (glutarredoxina1), *trxC* (tioredoxina 2), *fur* (proteína reguladora del hierro intracelular), el operón *suf* (implicado en la reparación de los centros metálicos [4Fe-4S]), entre otros.

Así, tras la activación de OxyR se desencadena una respuesta celular que trata de eliminar las ROS generadas, así como reparar los daños que se están generando en los diferentes componentes celulares. Es interesante que dos de los genes que se inducen por OxyR son *grxA* y *gorA*, ya que ambos codifican para las proteínas glutarredoxina 1 y glutathion reductasa, respectivamente, que junto con el glutathion son el sistema que provoca la inactivación *in vivo* de OxyR. Por tanto, OxyR es un sistema que se autorregula.

Entre los genes regulados positivamente por OxyR se encuentra la hidroxidroxidasa I (*katG*) y la alquil hidroxidroxidasa reductasa (*ahpCF*), estas enzimas confieren resistencia al peróxido de hidrógeno exógeno y mantienen los niveles adecuados de H₂O₂ endógenos. La concentración de H₂O₂ se mantiene en 0,2 μM. Se ha descrito que AhpCF es más eficiente que la catalasa en la detoxificación de H₂O₂ pero su actividad se satura a niveles relativamente bajos de H₂O₂ (Seaver *et al* 2001), por otro lado KatG tiene actividad catalasa y peroxidasa por lo que puede compensar la actividad de AhpCF cuando se produce su saturación (Loewen *et al* 1985).

Se ha descrito que OxyR se puede activar por compuestos diferentes al peróxido de hidrógeno como compuestos electrófilos (Zheng *et al* 1998) y óxido nítrico (Seth *et al* 2012).

OxyR es represor de varios genes y su oxidación inactiva esta función represora, activando los genes que este regulón controla. En *E.coli* OxyR oxidada induce los niveles de la peroxidasa NADH AhpCF, la catalasa (*katG*), una mini ferritina Dps, esta proteína se sintetiza para secuestrar el Fe no incorporado, (Chiancone *et al* 2010 , Grant *et al* 1998), la actividad de esta ferritina Dps junto con la acción de la proteína YaaA reduce las lesiones que se producen en el DNA (Liu *et al* 2011). YaaA una proteína que disminuye los niveles celulares de Fe con una función no definida actualmente pero que se postula que podría interferir en las diferentes vías del metabolismo del Fe, inhibiendo el transporte del Fe al interior de la célula, incrementando el eflujo del Fe, protegiendo las enzimas susceptibles de ser inactivadas por Fe (cluster Fe-S) o disminuyendo el Fe libre incrementando las enzimas que incorporan Fe. También la proteína oxidada OxyR regula los niveles de operón Fur, el represor Fur es el principal regulador de la homeostasis de Fe y se activa al unirse a Fe(II) o Fe(III) (Mills *et al* 2005), el complejo Fe(II) fur se une al ADN y reprime genes implicados en la adquisición de Fe (Chen *et al* 2007). Hasta 36 operones se modulan por Fe(II)-fur en *E.coli* (Andrews 2003). La homeostasis del hierro y el estrés oxidativo están conectados a través de interacciones regulatorias (Cornelis 2011). La actividad de Fur disminuye cuando se incrementan los niveles de H₂O₂, indicando que H₂O₂ inactiva la proteína y la inducción de *fur* por OxyR compensaría su inactivación por oxidantes.

OxyR también activa los genes *grxA*, *trxC*, *gorA* (glutaredoxina, tioredoxina y glutatión reductasa respectivamente), *dsbC*

(oxidorreductasa de ácido sulfénico), *sufABCDE* (ensamblaje de los centros Fe-S), *hemH* (ferroquelatasa), *mntH* (transportador de Mn). OxyR regula negativamente su propia expresión y de los genes *fhuF* (reductasa del ión férrico), *flu* (proteína de la membrana externa), *uxuAB* (manonato hidrolasa), *gntP* (gluconato permeasa). OxyR es reducido por el sistema glutaredoxin/GSH/*gor*. En la Tabla 2 se muestran los genes regulados por OxyR.

Tabla 2. Genes regulados por OxyR. (Imlay, 2015)

GEN	ACTIVIDAD	FUNCION
<i>katG</i>	Catalasa	Regula H ₂ O ₂
<i>ahpCF</i>	NADH peroxidasa	
<i>dps</i>	Mini-ferritina	Minimiza el nivel de hierro libre
<i>fur</i>	Represor del transporte de Hierro	
<i>yaaA</i>	Metabolismo de Hierro	
<i>mntH</i>	Transporte de Manganeseo	Activa enzimas mononucleares
<i>sufA-E</i>	Ensamblaje Fe/S	Enzimas que activan Fe/S
<i>hemF</i>	Coproporfirinogeno III oxidasa	Síntesis de Hemo
<i>hemH</i>	Ferroquelatasa	
<i>gor</i>	Glutation reductasa	Metabolismo de tioles
<i>trxC</i>	Tiorredoxina	
<i>grxA</i>	Glutation reductasa	
<i>dsbG</i>	Proteina sulfenato reductasa	

En la Figura 3 se muestra un esquema del regulón OxyR, con los genes que activa (+) y los genes que reprime (-).

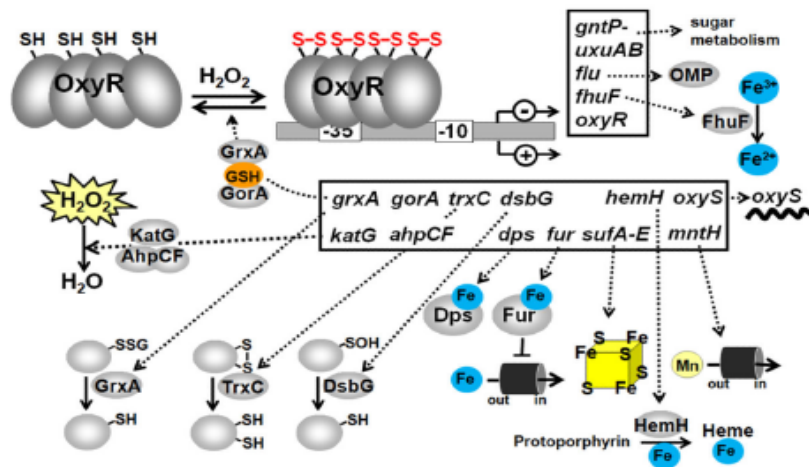


Figura 3. Esquema de la regulación de la defensa antioxidante en *E. coli* a través del regulón OxyR. (Adaptado de Imlay 2013)

2.5.2 SoxRS. Un sensor de superóxido y del estado redox celular

En *E. coli*, el regulón SoxRS es el principal sistema de defensa frente al superóxido generado durante el metabolismo aerobio de la célula, así como sistema de resistencia a antibióticos y a compuestos exógenos capaces de generar superóxido a través de ciclos redox (Touati 2000).

El mecanismo de acción de este regulón se produce en dos pasos (Figura 4). SoxR es la proteína sensora, que tras su oxidación en sus centros [2Fe-2S] induce la transcripción de un único gen, *soxS*. La proteína reguladora es SoxS, un factor transcripcional. SoxR es susceptible de oxidación por superóxido o por otros compuestos

redox. Además, *soxRS* también está regulado por el óxido nítrico (NO), a través de la nitrosilación de sus centros metálicos.

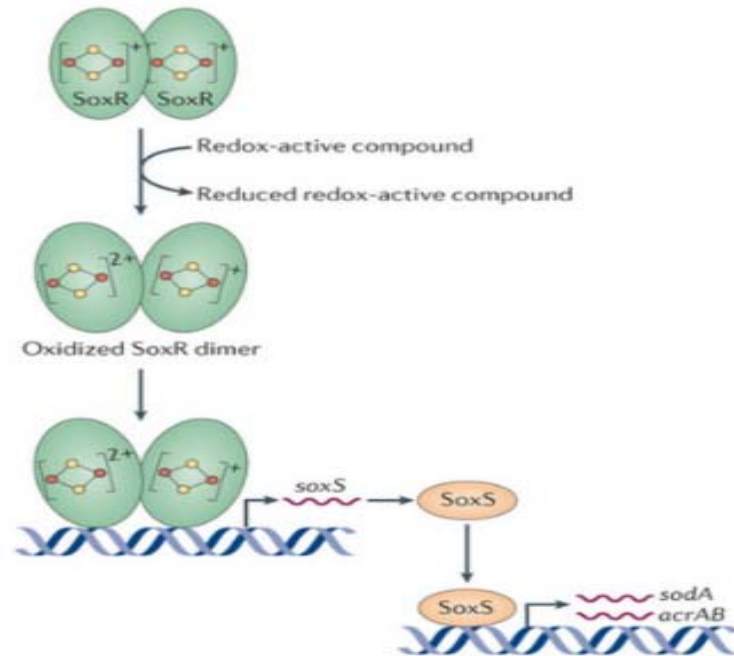


Figura 4. Regulación de *soxRS* (Adaptado de Imlay, 2013)

Tabla 3. Genes inducidos por SoxRS (Imlay et al 2008)

Enzimas deshidratasas resistentes a la oxidación	
<i>fumC</i>	Fumarasa C
<i>acnA</i>	Aconitasa A
Reparación de cluster	
<i>yggX</i>	Proteína de reparación del cluster Fe/S
<i>zwf</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
<i>fpr</i>	NADPH:flavodoxina/ferredoxina oxidoreductase
<i>fldA</i>	Flavodoxina A
<i>fldB</i>	Flavodoxina B
Eflujo de drogas y/o resistencia	
<i>acrAB</i>	Transportadores eflujo de fármacos
<i>tolC</i>	Componente OMP de los transportadores de eflujo de fármacos
<i>micF</i>	RNA antisentido de OmpF
<i>marAB</i>	Operón de resistencia múltiple a antibióticos
<i>nfnB</i>	Nitrorreductasa
<i>rimK</i>	Modificación de la proteína S6 ribosomal
Otros	
<i>nfo</i>	Endonucleasa IV
<i>fur</i>	Proteína reguladora de la captación de Hierro
<i>sodA</i>	Superóxido dismutasa dependiente de Manganeso
<i>ribA</i>	GMPc hidrolasa

La síntesis de la proteína reguladora SoxS provoca la inducción de al menos 14 genes: la Mn-superóxido dismutasa (*sodA*), que secuestra el superóxido, la endonucleasa IV (*nfo*), enzima reparadora de lesiones oxidativas del ADN, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que regenera el NADPH, el ARN *micF*, un ARN antisentido que reprime la expresión de la porina ompF, dos flavodoxinas (*fldA* y *fldB*) y su reductasa, ferredoxina (flavodoxina)-NADPH oxidoreductasa (*fpr*), que pueden facilitar el restablecimiento de los equivalentes redox, la fumarasa C (*fumC*), que reemplaza las fumarasas sensibles a superóxido, la

aconitasa A (*acnA*), que aunque presenta centros [4Fe-4S] sensibles a superóxido es más resistente a la oxidación que la aconitasa B (*acnB*), la proteína Fur (*fur*), regulador esencial del metabolismo del hierro (Tabla 3).

Además de la inducción de estos genes, parece ser que hay otros muchos implicados, ya que un estudio genómico ha puesto de manifiesto la inducción de 130 genes de respuesta a paraquat en *E. coli* (Banchard *et al* 2007).

SoxRS es un regulador de genes de respuesta al estrés oxidativo. Los genes *soxR* y *soxS* son adyacentes y divergentes en su transcripción (Weiss *et al* 1991). Las proteínas codificadas por estos genes constituyen un sistema regulador, en 2 etapas en el que cuando SoxR se activa, induce la expresión de *soxS*, el cual regula varios genes implicados en la defensa antioxidante.

SoxR es un regulador de la resistencia a agentes redox-cycling como el paraquat (Greenberg *et al* 1990, Tsaneva *et al* 1990).

Otros agentes que activan SoxR son el óxido nítrico, (Nunoshiba *et al* 1993) concentraciones altas de H₂O₂ (Manchado *et al* 2000). SoxR es un homólogo de la familia de proteínas MerR, es un homodímero que con dos centros 2Fe-2S, cuando se oxidan éstos centros la proteína oxidada es capaz de inducir la expresión de SoxS hasta 100 veces. (Hidalgo *et al* 1995). Estudios cristalográficos sugieren que el espacio del promotor del gen *soxS* se modifica por la proteína SoxR oxidada para inducir la transcripción por la RNA polimerasa (Hidalgo *et al* 1998). Cuando el estrés oxidativo se reduce existe en *E. coli* un sistema

reductasa capaz de revertir el efecto de la oxidación de la proteína SoxR, sistema rsxABCDGE (reductasa de *soxR*).

En el trabajo de Koo *et al* 2003 describen que los productos de los genes *rsx* y *rse* se encargarían de reducir SoxR. Dentro de las condiciones de crecimiento aeróbico enzimas específicas dependientes de NADPH mantendrían a SoxR en su forma reducida inactiva (Figura 4), se ha demostrado recientemente que la transcripción en SoxS está unida a los niveles de NADPH (Siedler *et al* 2014). Otros agentes que oxidan SoxR incluyen el NO y concentraciones elevadas de H₂O₂ (Nunoshiba *et al* 1993).

SoxR es activado directa o indirectamente por el radical superóxido (Liochev *et al* 1999) pero actualmente existe una controversia de si los agentes redox-clicling oxidan por ellos mismos la proteína (Imlay 2011) por otra parte el grupo de Fridovich demostraron que era el superóxido y no el paraquat por sí mismo el que activaba la proteína SoxR, son necesarios estudios adicionales para elucidar este problema.

2.5.3 Fur. El factor regulador del hierro intracelular protege del estrés oxidativo y nitrosativo

El hierro a pesar de jugar un papel muy importante en muchos procesos biológicos es un elemento potencialmente tóxico en determinadas condiciones. La dependencia de este metal ha hecho que las células hayan desarrollado sistemas de quelación de hierro externo, a través de la secreción de sideróforos, así como sistemas de transporte de los complejos hierro-sideróforo, y sistemas de

almacenamiento intracelular en forma de asociación con proteínas, como es el caso de la ferritina.

El transporte y almacenamiento de hierro dependen de la disponibilidad de hierro en el medio extracelular y está fuertemente regulado. Esta regulación está mediada por la proteína Fur acomplejada con hierro en estado ferroso Fe^{2+} (Hantke *et al* 2001). Alrededor de 100 genes son regulados por este sistema, donde al menos 60 codifican para proteínas relacionadas con la biosíntesis y transporte de sideróforos, otros 18 genes codifican para proteínas citoplasmáticas relacionadas con el metabolismo celular, con la manipulación del hierro y con sistemas de respuesta frente al estrés oxidativo.

Fur está bajo el control de SoxRS y OxyR. Tanto OxyR, en su forma activa, como SoxS, tras su activación mediada por SoxR, se une al promotor de *fur* aumentando el número de moléculas por célula de 5000 a 10000. El objetivo de esta regulación sería el de disminuir los niveles de hierro libre (Zheng *et al* 1999). Fur también es un sensor de los niveles intracelulares de NO (D'Autréaux *et al* 2002).

2.5.4 rpoS

rpoS, o *os*, es una subunidad sigma de la ARN polimerasa de *E. coli* que se induce bajo determinadas condiciones de estrés, así como tras la entrada en fase de crecimiento estacionario. Así, *rpoS* induce la expresión de más de 70 genes que confieren resistencia a la radiación ultravioleta, al choque por calor, choque osmótico y el provocado por acidificación del pH, intoxicación por etanol y, probablemente, otras

situaciones no identificadas. Otros genes dependientes de *rpoS* controlan cambios de la membrana celular y de la morfología total de la bacteria, así como funciones implicadas en el metabolismo celular; también se ha detectado regulación por *rpoS* de genes implicados en la muerte programada en *E. coli*, un sistema eficiente que sacrifica una parte de la población para mantener el resto de la población en condiciones de deficiencia de nutrientes, típico de entrada en fase estacionaria (Nyström 2004).

rpoS induce la síntesis de la catalasa HPII, aunque también se ha detectado la inducción de HPI. Otras proteínas de respuesta frente a estrés oxidativo también están reguladas por RpoS, de modo que aumenta su síntesis tras la entrada en fase estacionaria o en respuesta a diversos tipos de estrés, como es el caso de la glutathion reductasa (Becker-Hapak *et al* 1995) y de la proteína Dps.

2.5.5 Los factores de transcripción Fnr y NorR son esenciales frente al estrés nitrosativo

Fnr es un factor transcripcional con un centro [Fe-S] sensible al oxígeno, que regula la expresión de genes implicados en la respiración anaerobia y en el metabolismo del carbono.

Fnr reprime la expresión de la flavohemoproteína HmpA, pero la reacción del NO con el Fe de su centro metálico provoca la inactivación del factor transcripcional, perdiendo su actividad represora y, por tanto, induciendo la síntesis de la flavohemoproteína, una de las

principales defensas frente al estrés nitrosativo (Cruz-Ramos *et al* 2002).

NorR es un factor transcripcional de respuesta al NO. Presenta un hierro no hémico, cuya nitrosilación por NO provoca la activación del factor transcripcional, induciéndose la síntesis de dos funciones muy importantes para la detoxificación del NO, la flavorubredoxina y su flavoproteína asociada codificadas por los genes *norVW* (Hutchings 2002).

2.5.6. Funciones reguladas por *oxyR*, *soxRS*, *fur* y *rpoS*

2.5.6.1 Catalasas y peroxidasas regulan los peróxidos intracelulares

E.coli posee tres enzimas principales capaces de eliminar los peróxidos intracelulares, bien sea H₂O₂ o peróxidos orgánicos (Seaver *et al* 2001). La catalasa hidropoxidasa HPI (codificada por el gen *katG*) es una enzima de 337 KDa formada por 4 subunidades que contiene 2 grupos hemo; esta enzima tiene 2 funciones, la actividad catalasa que cataliza la transformación de 2 moléculas de H₂O₂ en 2 moléculas de H₂O y una de O₂, y una actividad peroxidasa de amplio espectro que cataliza la transformación de H₂O₂ en H₂O utilizando diferentes compuestos como reductores. La catalasa HPII (codificada por *katE*) es un tetrámero de 312 KDa que carece de actividad peroxidasa, pero su actividad catalasa es 6 veces superior a la de HPI. Existen diferencias a nivel de regulación celular entre las dos catalasas, *katG* forma parte del regulón OxyR, aunque también se ha detectado expresión de HPI en fase estacionaria dependiente de *rpoS*, y *katE* depende únicamente del regulón *rpoS*. Por tanto, HPI se expresa esencialmente en

respuesta al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , mientras que HPII supone una defensa antioxidante expresada únicamente en fase estacionaria. Ambas enzimas funcionan con concentraciones elevadas de peróxido de hidrógeno, a diferencia de la alquil hidroperóxido reductasa (codificada por el operón formado por los genes *ahpC* y *ahpF*), una peroxirredoxina análoga a la GSH-peroxidasa de eucariotas inicialmente identificado por su capacidad de detoxificar los peróxidos orgánicos intracelulares, pero que más tarde se detectó su capacidad de metabolizar el H_2O_2 incluso a concentraciones muy bajas. El sistema AhpCF consta de dos actividades independientes y bien diferenciadas. AhpC es un homodímero no hémico con actividad peroxidasa, perteneciente al grupo de las peroxirredoxinas, que cataliza la reducción del H_2O_2 o de otros peróxidos a costa de la formación de dos puentes disulfuro que mantiene unidas covalentemente las dos subunidades que conforman el enzima. La regeneración de AhpC en forma reducida se produce por la actividad AhpF, una flavoproteína con actividad reductasa, cuyo grupo prostético $FADH_2$ participa en la regeneración de la forma reducida de AhpC, con la colaboración de NAD(P)H. Este sistema de detoxificación de peróxidos también forma parte del regulón OxyR, por tanto, se induce en respuesta al estrés oxidativo (Figura 5).

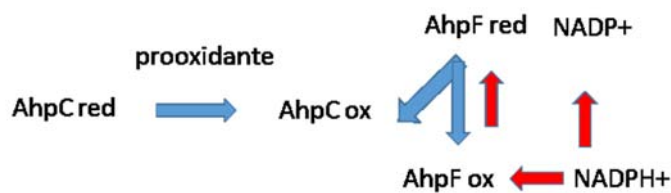


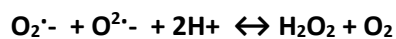
Figura 5. Ciclo catalítico del sistema AhpCF

Por tanto, ambas hidroperoxidasas (HPI y HPII) y el sistema AhpCF son capaces de detoxificar peróxido de hidrógeno, además los peróxidos orgánicos intracelulares son eliminados por AhpCF. Mientras HPI y AhpCF se integran en una respuesta frente al estrés oxidativo durante el crecimiento exponencial, a través de OxyR, HPII está implicada en una respuesta de protección antioxidante que se induce tras la entrada en fase exponencial. En estudios recientes se ha determinado actividad catalasa en el citocromo bd (Borisov *et al* 2013).

2.5.6.2 Superóxido Dismutasas (SODs)

En *E.coli* hay 3 enzimas que regulan los niveles de superóxido.

La reacción que catalizan estas proteínas es la dismutación del superóxido



Estas enzimas están presentes en todas las células aerobias y mantienen el superóxido en un nivel estable de 10^{-10} M.

La diferencia entre las tres proteínas radica en su localización celular y en su regulación, lo que conlleva diferencias en cuanto a la procedencia del superóxido que van a detoxificar, así como el momento en que se va a requerir su actuación.

La CuZnSOD (sodC), una proteína monomérica localizada en el periplasma de *E. coli* se encuentra bajo el control del regulón RpoS, se induce en fase estacionaria.

La MnSOD (sodA) es un dímero con localización citosólica y regulada por múltiples factores *soxRS* y *fur*, se han descrito otros sistemas de

regulación, como ArcA-ArcB y Fnr que regulan su expresión en anaerobiosis, o MarA que controla la transcripción dentro de un sistema de resistencia a fármacos. SoxRS induce positivamente *sodA* a través de la unión del factor transcripcional SoxS al promotor de *sodA* tras la activación de SoxR. Por otro lado, la proteína reguladora del hierro intracelular Fur reprime la transcripción de *sodA* cuando está en su forma activa formando un complejo con el Fe^{2+} .

La FeSOD (*sodB*) tiene localización citosólica. El único regulón que controla *sodB* es Fur, donde su forma activa ($Fur-Fe^{2+}$) activa la transcripción de *sodB*, a través de un mecanismo desconocido donde un ARN no codificante (RhyB) actuaría como mediador.

Una segundo grupo de enzimas que permanece en estudio son las enzimas superóxido reductasa, éstas proteínas tienen Fe (1 o 2 átomos) y están en estudio su funcionalidad ya que en principio se habían descrito su expresión en anaerobiosis pero actualmente se ha observado que pueden funcionar en aerobiosis (Imlay 2008, Sheng *et al* 2014).

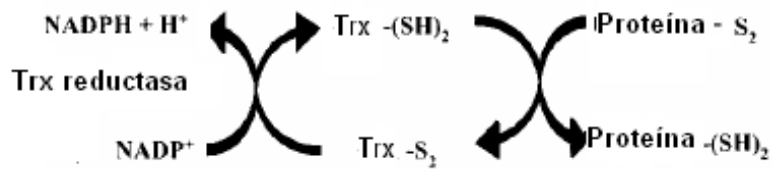
2.5.6.3. Los sistemas tiorredoxina/tiorredoxina reductasa y glutarredoxina/glutation/ glutation reductasa

En *E. coli* hay dos vías que utilizan el potencial reductor del glutarredoxina (Grx)/glutation (GSH)/GSH reductasa (GR) (Beckwith *et al* 2001)

A) Trx/Trx reductasa:

La reacción que catalizan se muestra en la Figura 6. La Trx reduce los puentes disulfuro proteicos a costa de quedar en estado oxidado,

punto en el que interviene la Trx reductasa utilizando NADPH para regenerar el centro activo de la Trx. *E. coli* tiene dos tiorredoxinas, la Trx 1 (trxA) y la tiorredoxina 2 (trxC). Trx2 se expresa a niveles 10 veces inferior a los de la Trx1, y está regulada por OxyR como parte de la respuesta antioxidante celular frente al H₂O₂. Por otro lado, Trx1 se induce en fase estacionaria a través de un modo independiente de rpoS. Un ejemplo de la importancia de estas funciones es la observación de que mutantes en ambas tiorredoxinas presentan una mayor resistencia al H₂O₂, probablemente por la activación constitutiva del factor OxyR.

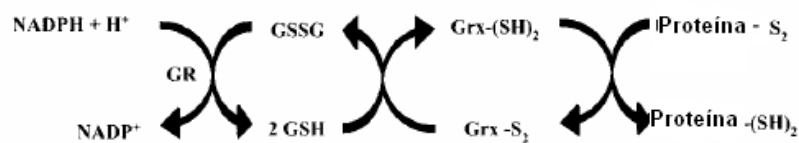


**Figura 6. Ciclo catalítico del sistema tiorredoxina
(Trx/Trx reductasa)**

E. coli posee el sistema glutarredoxina (Grx)/glutation (GSH)/GSH reductasa (GR). En la Figura 7 se muestra el ciclo catalítico de este sistema: la Grx cataliza la reducción de puentes disulfuro proteicos utilizando GSH como reductor, que posteriormente se regenera por la actividad GSH reductasa (GR) y el consumo de NADPH.

Este sistema es menos eficiente que la tiorredoxina en la reducción de puentes disulfuro proteicos, aunque puede reducir puentes disulfuro mixtos entre GSH y proteínas.

E. coli posee tres glutarredoxinas. La Grx 1 (grxA) está regulada, junto con glutatión reductasa (gor), por oxyR como respuesta frente al estrés oxidativo. Este sistema Grx1/GR junto con el GSH es capaz de regenerar los puentes disulfuro que provocan la activación del factor transcripcional OxyR; por tanto, su inducción implica un sistema de autorregulación de OxyR, ya que en ausencia de estos sistemas reductores, la proteína permanecería continuamente oxidada y, por tanto, activada de forma constante. La Grx2 es la mayoritaria, ya que se expresa 2 veces más que la Grx3 y 25 veces más que la Grx1. Existe una diferencia entre las proteínas que pueden reducir, por ejemplo, la ribonucleótido reductasa sólo es sustrato de Grx1, mientras que las otras dos enzimas son incapaces de reducirla, probablemente por los diferentes potenciales redox de las 3 glutarredoxinas.



**Figura 7. Ciclo catalítico del sistema glutarredoxina
(Grx/ GSH / GSH reductasa)**

2.5.6.4. Dps, una proteína que evita la reacción de Fenton en las proximidades del ADN

Dps es una proteína de unión al ADN que posee una función similar a la de las ferritinas, capaces de unir Fe^{2+} . Sin embargo, presenta una diferencia con respecto a éstas en cuanto a que no es eficientemente oxidada por el O_2 , pero sí por el H_2O_2 . Dps también protege a las células

en condiciones de deprivación nutricional. Esta proteína tiene tres propiedades intrínsecas, unión al DNA, secuestradora de hierro y actividad ferroxidasa (Calhoun *et al* 2011), La expresión de dps está controlada por OxyR (Zhao *et al* 2002). Los mecanismos protectores frente al estrés están por estudiar.

2.5.6.5. Las funciones reguladas por FNR y NorR son esenciales para controlar el estrés nitrosativo

En el estudio llevado a cabo por Spiro 2006 sobre los diferentes regulones implicados en la defensa frente al estrés nitrosativo se concluyó que al someter a las células a estrés se produce una reacción con el represor FNR, este represor regula la expresión de genes importantes en la defensa frente al estrés nitrosativo como la flavohemoproteína *hmpA*. FNR es el represor de *hmpA*, cuando se produce una nitrosación en la proteína FNR esta se inactiva y se expresa la flavohemoproteína. Esta proteína tiene dos dominios. Uno de los dominios es un módulo globina con un grupo hemo B, el otro tiene una clara homología con la familia de las ferredoxina-NADP⁺-reductasas con capacidad de unir FAD y NAD(P)H. Esta proteína produce la detoxificación del NO tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, dando lugar a la formación de NO₃⁻ y a N₂O, respectivamente, a costa de la oxidación del NAD(P)H (Frey *et al* 2002).

Otra actividad capaz de reducir el NO es la que posee el sistema flavorubredoxina y flavorubredoxina reductasa, inducido tras la activación de NorR por el NO.

2.5.6.6. Otros sistemas de defensa frente al estrés oxidativo

2.5.6.6.1 Extrusión de antibióticos y redox cycling

El regulon SoxR controla la expresión de los genes *acraB* implicados en el sistema de extrusión de drogas. AcraA periplásmico y AcraB colaborando con TolC regulan este eflujo. Este sistema defiende a la célula frente a la toxicidad producida por los compuestos redox

2.5.6.6.2. Protección de los centros Fe-S de las proteínas

Las proteínas implicadas en el proceso de reparación de los centros 4Fe-4S son YtfE y YggX (Justino *et al* 2007, Gralnick *et al* 2001). El mecanismo aún no está bien estudiado, la regulación de YggX se lleva a cabo por parte del regulon SoxRS (Pomposiello *et al* 2003).

2.5.6.6.3. Inducción de enzimas resistentes a la oxidación

Las enzimas fumarase A y aconitase B son muy sensibles a la oxidación. Al inducirse SoxRS se sintetizan en su lugar fumarase C y aconitase A que son resistentes a la inactivación por oxidantes (Liochev *et al* 1992, Cunningham *et al* 1997), fumarasa C no posee centros Fe-S, aconitasa A los posee pero, o bien no expone en su molécula estos centros, o bien es capaz de repararlos rápidamente.

2.5.6.6.4. Sistemas Isc y Suf

Uno de los principales usos del hierro es formar parte de los centros Fe-S. Estos centros Fe-S se encuentran en proteínas de eucariotas también. Las bacterias poseen 2 sistemas encargados de sintetizar estos centros Fe-S.

A) Sistema Isc (hierro-S cluster protein)

Compuesto por el grupo de genes *iscSUA-hscBA-fdx* cada una de las proteínas que codifican tienen una función en el proceso de síntesis del cluster, tomar del S de las cisteínas o atrapar el Fe y convertirse en chaperona de este metal. Están regulados por un represor que es IscR (Kato *et al* 2002).

B) Sistema suf

Este sistema está compuesto por los genes *sufABCDE* siendo *sufA* y *sufB* homólogos a *iscA* e *iscB* respectivamente. El operón es reprimido por el factor de transcripción Fur, y es inducido por H₂O₂.

El operón Suf es responsable de la formación y reparación de los clusters dentro de condiciones de estrés oxidativo o de bajo nivel de hierro. Apo-IscR regula positivamente el operón Suf, encontrándose una comunicación entre las dos vías. (Imlay 2008, Outten *et al* 2004).

3. UNA NUEVA HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LOS PROCESOS OXIDATIVOS EN BACTERIAS: CITOMETRÍA DE FLUJO

Las técnicas todavía más usadas para el estudio de los microorganismos incluyen el cultivo, los inmunoensayos, la visualización por microscopía óptica y de fluorescencia y, más recientemente, las técnicas avanzadas de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Estas técnicas se han utilizado a lo largo de los años por su sencillez de uso, tradición, disponibilidad en el laboratorio y bajo coste, pero no son útiles en absoluto para proporcionar información bioquímica y, mucho menos, para determinar fenómenos de heterogeneidad en los procesos metabólicos de interés. En los últimos años, la Citometría de Flujo (CMF) se ha convertido en una herramienta fundamental en la Microbiología, al combinar la detección directa y rápida de microorganismos con la descripción de sus propiedades morfológicas y de muchas características bioquímicas y fisiológicas, examinadas en una población microbiana a nivel de las células individuales que la componen.

Con respecto al interés de nuestro laboratorio en los mecanismos de control del estrés oxidativo en bacterias, la capacidad multiparamétrica de la CMF y la creciente disponibilidad de reactivos fluorescentes sensibles a las diferentes ROS, utilizados ampliamente en células eucariotas, permitía considerar esta metodología como la mejor herramienta para llevar a cabo nuestros estudios. Sin embargo existen todavía muy pocos ensayos funcionales para caracterizar la bioquímica y la fisiología de bacterias vivas y, hasta el momento de iniciar los estudios experimentales de esta Tesis Doctoral, no se habían

publicado trabajos que aborden el estrés oxidativo en modelos microbianos utilizando la CMF como herramienta analítica.

Sin embargo, en la literatura disponible se encuentran trabajos de revisión importantes sobre el gran aumento de la influencia de la CMF en la detección y estudio de la fisiología microbiana en el ámbito clínico, biotecnológico y medioambiental. Dos revisiones importantes (Alvarez-Barrientos *et al* 2000 y Piretti *et al* 2012) que ilustran los grandes retos que tiene para la citometría el estudio de los microorganismos.

Las aplicaciones más importantes de la citometría dentro de la microbiología se pueden resumir en diferentes campos:

- Detección directa de parásitos, hongos y virus así como su cuantificación (Clarke *et al* 1998).
- Diagnostico serológico, capaz de determinar en suero anticuerpos frente a microorganismos, pudiéndose detectar por la característica multiparamétrica varios microorganismos al mismo tiempo.
- Susceptibilidad frente a antibióticos, antifúngicos o antivirales. Utilizando sondas fluorescentes que determinan la integridad de la membrana se puede medir la susceptibilidad o resistencia frente a un fármaco, droga, xenobiótico, permitiendo estudiar el mecanismo de acción de un compuesto determinado. (Alvarez-Barrientos 2000).
- Estudio de la relación patógeno-huesped. Existen muchos estudios sobre la interacción de las células eucariotas con los microorganismos (fagocitosis) (Aderem *et al* 1999) y estudios de

la expresión de receptores de las células eucariotas tras una infección microbiana (Kawai *et al* 2011).

La citometría de flujo por lo tanto es una poderosa herramienta diagnóstica que posibilita el análisis de poblaciones celulares en base a sus características celulares (Brehm-Stecher, 2004).

Pieretti *et al* 2012 describe algunas de las técnicas empleadas para el estudio de la identificación y en la fisiología de los microorganismos. La citometría de flujo se sirve de los fluorocromos o anticuerpos conjugados para determinar aspectos celulares del organismo procarionota.

Los fluorocromos pueden ser clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción: aquellos cuya fluorescencia aumenta con la unión a compuestos celulares específicos tales como proteínas (fluoresceína isotiocianato, FITC), ácidos nucleicos (yoduro de propidio, PI) y lípidos (Rojo Nilo, NR); aquellos cuya fluorescencia depende de parámetros fisiológicos (pH, potencial de membrana, radicales libres) y aquellos cuya fluorescencia depende de la actividad enzimática (sustratos fluorogénicos) tales como esterasas, peroxidasas, y peptidasas. Los fluorocromos también se conjugan con anticuerpos o sondas nucleicas para detectar directamente antígenos microbianos, ADN o ARN. En los últimos años estudios de citometría y microbiología está en aumento (Mueller *et al* 2009). El uso de los parámetros morfológicos junto con parámetros de fluorescencia proteínas, DNA ha permitido detectar diferentes géneros bacterianos como *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Fusarium* (Alvarez *et al* 2000).

El estudio del metabolismo también ha sido importante hacerlo por CMF, de esta manera se puede detectar niveles de proteínas, producción de especies reactivas, pH intracelular, ciclo celular, detección de la viabilidad (bacterias vivas y muertas o durmientes), detección de células Gram (+) y Gram (-), estudio de expresión génica utilizando proteínas fluorescentes (GFP).

3.1 Aplicaciones de la CMF en Microbiología Clínica

3.1.1 Bacterias

Pianetti et al 2005 comparó los métodos tradicionales como espectrofotometría y contaje en placa usados en el contaje de células con CMF para determinar la viabilidad de *Aeromonas hydrophila* en diferentes tipos de aguas, aguas de río, de manantial, agua salobre, agua mineral. El estudio de la determinación de la viabilidad por citometría de flujo se llevó a cabo usando una técnica de tinción dual capaz de distinguir bacteria viable de bacterias muertas. El método en placa es un método ampliamente utilizado pero sólo informa de la viabilidad y de la capacidad de crecer, el método de absorbancia informa de la densidad del cultivo. Estos autores ensayaron un método de doble tinción de ácidos nucleicos – SYBR Green I y PI; con la doble tinción pudieron distinguir células viables, células con membrana plasmática dañada y células con la membrana plasmática comprometida.

Los resultados obtenidos con las técnicas convencionales no correlacionaban con los datos obtenidos por CMF. La técnica citométrica mostró que había células viables a densidades ópticas

bajas y que no se detectaban por la técnica del conteo en placa. Además permitía la detección rápida de células que estaban en un estadio de viable pero no cultivable, que no era detectable por métodos convencionales.

Se ha diseñado una estrategia para identificación y caracterización de una proteína asociada a la formación de biofilm, esta bacteria es *Acinetobacter baumannii*, un patógeno oportunista que coloniza ambientes hospitalarios (Lochfelm *et al* 2008).

Otra aplicación sería la cuantificación de bacterias marcadas fluorescentemente en aguas para el consumo humano (Besmer *et al* 2014).

Se proponen diferentes métodos para cuantificar y detectar *Legionella pneumophyla* en muestras de agua (Fuchslin *et al* 2010). En el estudio de Kim *et al* 2009 se describen anticuerpos específicos para bacterias y toxinas seleccionadas conjugándose con microesferas codificadas.

3.1.2 Hongos

El uso de la CMF para detectar hongos fue descrito por Libertin *et al* 1984 para detectar *Pneumocystis jirovecii*, este hongo es responsable de neumonía en pacientes inmunodeprimidos. Barbosa *et al* 2010 analizó 420 muestras comparando la citometría de flujo con microscopía de fluorescencia, todos los casos positivos detectados por microscopía fueron positivos por CMF, pero 8 muestras clasificadas como negativas por microscopía fueron positivas utilizando la técnica de CMF, de nuevo la técnica citométrica demostró ser más sensible y específica. Los trabajos de Prigione *et al* 2004 permitían al

enumeración de hongos, proponiéndose como alternativa a métodos tradicionales. Page *et al* 2005 desarrolla ensayos para identificar distintas especies de *Candida* usando un método de hibridación directa. La susceptibilidad a antifúngicos también se ha llevado a cabo por CMF utilizando la sonda fluorescente fun-1 que aumenta su fluorescencia en levaduras activas metabólicamente (Millard *et al* 1997), Mitchell *et al* 2005 describen la obtención de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de antifungicos por citometría de flujo. También en el campo de los mecanismos de acción de las diferentes drogas existen publicaciones que detectan la presencia de bombas de eflujo por CMF (Yang *et al* 1999, Stringaro *et al* 2002) y se encuentran estudios multiparamétricos de medida de radicales libres, potencial de membrana mitochondrial, muerte celular y apoptosis en diferentes especies de *Candida* (Neto *et al* 2014, Bradner *et al* 2003).

3.1.3 Parásitos

La detección por CMF de parásitos tiene un gran desarrollo en el estudio de la malaria con el parásito *Plasmodium falciparum* como diana de ésta técnica. Los eritrocitos a los que el *Plasmodium* infecta tienen ADN, por lo que utilizando sondas fluorescentes para detectar la presencia de ADN se puede cuantificar si un paciente está infectado con el parásito.

El “gold standard” del contaje de la parasitosis es la microscopía, pero ésta técnica consume tiempo, es difícil y requiere alto grado de entrenamiento, la citometría de flujo es una herramienta más accesible a los laboratorios de investigación y clínicos. El carácter multiparamétrico de la citometría de flujo hace que se pueda medir

simultáneamente los antígenos del *Plasmodium* que se expresa en la superficie del eritrocito utilizando para ello anticuerpos conjugados, o determinar la viabilidad del parásito (Janse *et al* 1994). En el caso de *Plasmodium vivax* se ha publicado un método para su detección (Roobsoon *et al* 2014) diferente ya que este parásito infecta a reticulocitos que contienen altos niveles de ácidos nucleicos, este grupo ha desarrollado un anticuerpo frente a la proteína BIP del retículo endoplásmico del parásito.

3.1.4 Virus

Con la citometría de flujo es posible detectar y cuantificar células infectadas con virus. Se pueden detectar componentes particulares de los virus como proteínas y ácidos nucleicos.

Se puede detectar simultáneamente la presencia de CMV, HSV, HBV en órganos que han de ser transplantados.

El gran reto de la citometría de flujo se produjo con la pandemia del SIDA, se desarrollaron protocolos citométricos para detectar los niveles de linfocitos CD4, actualmente se puede determinar la carga viral (Greve *et al* 2009), los autores combinaron la tecnología de la PCR con la citometría. Después de amplificar el genoma del virus con PCR mediante primers específicos, los productos se capturan en micropartículas y se analizan por CMF. Los autores muestran en su trabajo que la citometría tiene la misma capacidad que las técnicas moleculares para determinar la carga viral y calculan también una reducción del coste por ensayo utilizando CMF.

Debido a la característica multiparamétrica de CMF se puede analizar varios parámetros en células infectadas, así como cuantificar las células que han sufrido la infección vírica. Para ello se usan métodos de detección directa e indirecta de anticuerpos fluorescentes frente a determinadas partes del virus, la CMF permite también la detección simultánea de varios virus en una muestra al utilizar diferentes anticuerpos conjugados frente a diferentes antígenos virales (Pieretti *et al* 2012). Brussaard *et al* 2004 describen un ensayo por CMF para enumerar diferentes virus utilizando sondas fluorescentes específicas de ácidos nucleicos. Araujo *et al* 2011 detectan con la tecnología basada en citometría de flujo, luminex, diferentes niveles en tanto en plasma como en suero del virus de la hepatitis C, pudiendo diferenciar entre fase aguda y fase crónica de la enfermedad.

3.2 Aplicaciones de la CMF en Biotecnología

3.2.1 Aplicaciones en seguimiento de procesos fermentativos y bioindustriales

La CMF se está aplicando en el campo de los biocombustibles, en el estudio de Lopes da Silva *et al* 2012 se hace un análisis pormenorizado de las ventajas de la citometría en la monitorización de estos bioprocesos llevados a cabo por bacterias o levaduras, indicando que la técnica tendrá un mayor desarrollo con software de análisis más sofisticados que permitan la detección rápida de los cambios que se pueden producir en los cultivos (cambios en pH, ROS, lípidos, viabilidad).

El estudio de los diferentes parámetros fisiológicos bacterianos como puede ser el potencial de membrana plasmático, viabilidad celular o la funcionalidad de las bombas de extrusión de compuestos son muy importantes en los diferentes procesos industriales que utilizan microorganismos, biorreactores, tanto en la industria alimentaria como en la industria farmacéutica.

La heterogeneidad microbiana que se produce en un biorreactor no se ha podido detectar con la citometría de flujo.

En el estudio de Brognaux *et al* 2013 los autores describen un sistema por el cual acoplado un citómetro de flujo como BD ACCURI C6 al bioreactor y teniendo una bacteria fluorescente (GFP) se puede determinar *in situ* los cambios fisiológicos que se producen en la viabilidad del microorganismo al fermentar diferentes sustratos.

3.2.2 Aplicaciones de la CMF en el control de calidad de los alimentos

Una revisión importante de este aspecto industrial se encuentra en Diaz *et al* 2010, actualmente la citometría de flujo en los procesos alimentarios se considera una herramienta de control de calidad para análisis de alimentos y bebidas. La rápida detección de posibles problemas de presencia de contaminaciones producidas por el crecimiento bacteriano indeseable en los procesos de producción evita la pérdida de las propiedades organolépticas y composición o funcionalidad de los productos finales (Melin *et al* 2006).

3.2.3. Aplicaciones de la CMF en la industria farmacéutica

En la industria farmacéutica se han desarrollado ensayos fusionando bacterias fluorescentes. Un ejemplo de ello se observa en el trabajo

presentado por Henriques *et al* 2013 con el gen Bcr-Abl tirosinquinasa, una diana oncogénica y una proteína modelo en estudios del cancer, diferentes sustratos se adicionan a las bacterias que llevan este gen fusionado con GFP y la actividad quinasa y su fosforilación se examina y se cuantifica por citometría de flujo.

3.2.4. Aplicaciones de la CMF en la industria láctea

Las bacterias lácticas se utilizan en la industria alimentaria en la producción de queso, yogurt, probióticos. La citometria de flujo es una técnica de elección para la evaluación del estado fisiológico de las células antes de inocular los fermentadores, así como predecir la actividad celular y monitorizar el daño celular a través de procesos de preservación o de diferentes tratamientos (Bunthof *et al* 2002, Flint *et al* 2007).

Por otro lado, la fabricación de productos lácteos requiere de controles de calidad en todo el proceso de producción la citometría está presente en cada una de estas etapas (Ruszczynska *et al* 2007). La identificación y cuantificación de los microorganismos se puede realizar por citometría así como la presencia que bacteriófagos que pueden infectar las lactobacterias (Michelsen *et al* 2007).

3.2.5. Aplicaciones de la CMF en la industria de bebidas alcoholicas

Esta aplicación sobre todo en la producción de cervezas, vino y sidra, la mayoría de aplicaciones se centran en el control del proceso fermentativo y análisis del control de calidad. En todos estos procesos, el tamaño de la levadura se evalúa por los parámetros morfológicos del citómetro – forward scatter vs side scatter- mientras los

contenidos de ADN, lípidos, proteína, contenido de glucógeno se evalúa con sondas fluorescentes (Muro *et al* 2006). La monitorización del estado fisiológico con el ciclo celular es importante cuando se comienza el ciclo fermentativo así como estudios de la vitalidad de la población celular (Bouchez *et al* 2004). En la fermentación vinícola Rodríguez *et al* 2008 discrimina entre levaduras viables y no viables y controla así el proceso fermentativo.

3.3 Complicaciones en el estudio funcional de bacterias por CMF.

A nivel técnico el trabajar con células de menor tamaño que una célula eucariota ha sido posible gracias a diferentes ajustes realizados en los citómetros. Por ejemplo, ya existen citómetros con un ángulo especial en el detector Forward scatter (FS) para medir partículas de menor tamaño como puede ser bacterias, virus, micropartículas.

Por otro lado las características de los propios microorganismos hacen que su utilización en el campo de la citometría de flujo tenga que adaptarse para optimizar su detección. Una bacteria tiene una constitución diferente a una célula eucariota, muchos de los géneros bacterianos poseen una pared externa, bacterias Gram(-), que las hace impermeables a la tinción con sondas fluorescentes y a su vez presentan bombas de extrusión de compuestos que poco tiene que ver con una membrana plasmática eucariota. En esta Tesis se resolverá este problema con la utilización de bacterias con la pared celular modificada genéticamente. En la literatura se describen métodos para permeabilizar la pared bacteriana y hacer posible la entrada de sondas fluorescentes (Güntheret *et al* 2008, Shapiro *et al* 2004).

En las bacterias Gram(-) (Figura 8) la pared bacteriana excluye la mayoría de moléculas lipofílicas o hidrofóbicas, estas incluyen drogas como la tetraciclina o sondas como las cianinas útiles para determinar el potencial de membrana plasmático por citometría de flujo. Este problema se ha intentado solventar utilizando compuestos capaces de permeabilizar la pared con EDTA. Fisiológicamente no se puede asegurar que éstas bacterias permeabilizadas se comporten de igual manera que las células intactas, para estudios en los que la célula procariota no necesite estar en condiciones viables se puede utilizar este tipo de metodología pero no se puede usar cuando se quieren observar cambios fisiológicos en células viables. Un problema adyacente al estudio de los microorganismos es que su tamaño dificulta discriminar el ruido del citómetro de la célula procariota, para resolver el problema la tinción con sondas fluorescentes ayuda a discriminar la célula del debris. Los estados fisiológicos por los que puede pasar un cultivo bacteriano producen una diferencia en su morfología citométrica (tipo de medio de cultivo, densidad óptica, estado exponencial o estacionario, esporulación) por lo que es preciso tenerlo en cuenta en los estudios citométricos microbianos.

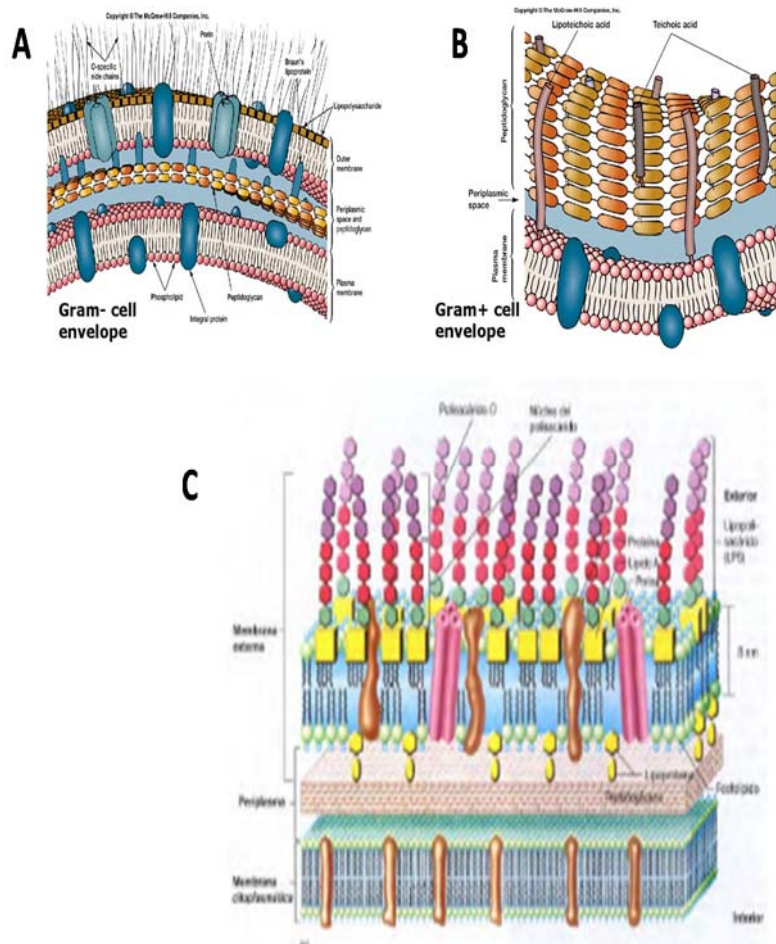


Figura 8. Composición de las membranas de células bacterianas. Esquema de la estructura de la membrana externa de las bacterias Gram- (A) y Gram+ (B). Se muestra la composición de la membrana de *E.coli* (C).

3.4. El estudio del estrés oxidativo por CMF

Como se ha comentado previamente, el análisis de la actividad oxidativa es un aspecto especialmente difícil, por la complejidad de los procesos bioquímicos implicados y por la limitada vida media de las diferentes ROS y RNS que participan en los mismos. En los últimos años, este problema se ha abordado satisfactoriamente gracias al desarrollo de nuevos reactivos fluorogénicos, capaces de transformarse en sondas fluorescentes tras un proceso, más o menos específico, de oxidación por ROS o RNS.

En la actualidad, la determinación del estrés oxidativo en células se realiza mediante ensayos basados en pruebas fluorescentes. Técnicamente, se basan en la adición de un compuesto no fluorescente (sustrato fluorogénico), el cual es rápidamente oxidado al reaccionar con especies oxidantes, transformándose en un compuesto fluorescente y cuya emisión es detectada por el citómetro de flujo o por el fluorímetro. Los principales sustratos fluorogénicos se describen a continuación.

3.4.1. Sustratos para el análisis de la actividad peroxidativa

Dihidrorodamina 123 (**DHR-123**): Es una molécula fluorogénica que difunde pasivamente a través de las membranas por su naturaleza lipofílica y su carga positiva. En el interior de la célula, es oxidada a rodamina 123. La molécula en su forma fluorescente se excita con una longitud de onda de 480nm y emite a una longitud de onda de 530nm.

Dihidrodiclorofluoresceína Diacetato (**DHCF-DA**): Se trata de un compuesto que pasa libremente a través de la membrana celular y una

vez dentro de la célula es diacetilado por esterasas celulares a diclorofluoresceína (DCFH) no fluorescente, la cual a su vez, es atrapada por la célula debido a su naturaleza polar, siendo convertida por oxidantes intracelulares a la molécula fluorescente diclorofluoresceína (DCF). La DCF-DA es excitada a 488nm y tiene un pico de emisión a 520nm.

3.4.2. Sustratos para el análisis del anión superóxido

Dihidroetidina (**HE**): Es un compuesto fluorogénico altamente selectivo para la detección de superóxido en el citosol de células vivas. Es un indicador fluorogénico derivado por reducción química del hidroetidio que, tras ser oxidado por el ión superóxido, se transforma en bromuro de etidio que se une al DNA y emite a una longitud de onda de 630nm cuando se excita a 488nm.

MitoSOX Red (**MitoSOX**): El indicador MitoSOX es un novedoso marcador para la detección selectiva de superóxido en la mitocondria. Es permeable en las células vivas siendo selectivamente introducido en la mitocondria. Una vez en ella, el reactivo MitoSOX es oxidado por superóxido y exhibe una débil fluorescencia roja al unirse con ácidos nucleicos. El MitoSOX es excitado a 488nm y tiene un pico de emisión a 580 nm.

3.4.2. Sustratos para el análisis de Oxido Nítrico

4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (**DAF-FM**): DAF-FM Diacetato es un indicador fluorescente para la detección de óxido nítrico (NO) a bajas concentraciones. Es un compuesto no fluorescente hasta que reacciona con NO formando un compuesto fluorescente, el benzotriazol. En la célula, DAF-FM-DA se transforma en

DAF-FM por esterasas celulares. La fluorescencia se mide mediante longitudes de onda de excitación y emisión de 485nm y 515nm respectivamente.

Las sondas fluorescentes descritas se pueden utilizar en experimentos a tiempo final, incubando las sondas con las células durante 15-30 minutos y analizar con el citómetro. Una aproximación más interesante es la de la citometría en tiempo real o *In fluxo*, en estos ensayos se detectan las especies reactivas en el momento en el que se están produciendo en las células, utilizando para ello el parámetro tiempo. Se puede de esta forma observar cambios rápidos que se producen en los cultivos bacterianos después de tratamientos con prooxidantes o antioxidantes.

OBJETIVOS

1. Puesta a punto de ensayos citómicos utilizando cepas bacterianas de E.coli B con la membrana externa modificada genéticamente facilitando la tinción con fluorocromos.
2. Ensayos citómicos utilizando cepas de E.coli B deficientes en distintas vías de defensa antioxidante para la detección y estudio de ROS y RNS.
3. Aplicación de los ensayos citómicos a diferentes compuestos generadores de ROS: Catecol, Catecolaminas, derivados del Tideglusib.

METODOLOGÍA

1. REACTIVOS Y SOLUCIONES

- **LB (Luria Broth):** Bacto Triptone (Difco) 10 g, Yeast extract (Difco) 5 g, NaCl 5 g, Agua destilada, csp 1000 mL. Disolver y autoclavar 30 min.
- **Molten top agar:** Agar (Difco) 6 g, NaCl 5 g, Agua destilada, csp 1000 mL. Disolver y autoclavar 30 min.
- **LA (LB agar):** Bacto Triptone (Difco) 10 g, Yeast extract (Difco) 5 g, NaCl 5 g, Agar (Difco) 20 g, Agua destilada, csp 1000 mL. Disolver y autoclavar 30 min.
- **H₂O₂** (Sigma-Aldrich) 100 mM en agua.
- **Tert butilhidroperóxido** (Sigma-Aldrich) 100 mM en agua.
- **Plumbagina** (Sigma-Aldrich) 1 mg/mL en DMSO
- **Menadiona** (Sigma-Aldrich) 10 mg/mL en DMSO
- **Paraquat** (Sigma-Aldrich) 10 mg/mL en agua
- **NO₃CU** (Sigma-Aldrich) 40 µg/mL en agua
- **Espermina/NO** (Sigma-Aldrich) 25 µg/mL en agua
- **DEA/NO** (Sigma-Aldrich) 25 µg/mL en NaOH 1mM
- **SIN-1** (Sigma-Aldrich) 50 µg/mL en agua
- **Melatonina** (Sigma-Aldrich) 2mM en agua
- **Gramicidina** (Sigma-Aldrich) 2.5 µg/mL en agua
- **FCCP** (Sigma-Aldrich) Solución 1mg/mL 80 µM en DMSO

2. SONDAS Y REACTIVOS FLUORESCENTES

- **DCDHF-DA** (Molecular Probes). 10 µg/mL en DMSO.
- **HE** (Molecular Probes) 10 µg/mL en DMSO.
- **DHR123** (Molecular Probes) 1 µg/mL en DMSO
- **HgOr** (Sigma-Aldrich) 100 µM en acetona
- **PI** (Sigma-Aldrich) 10 µg/mL en agua
- **EB** (Sigma- Aldrich) 10 µg/mL en DMSO
- **Rojo Nilo** 1 µg/mL en Etanol absoluto
- **FITC** (Molecular probes) 1µg/mL solución final en DMSO
- **DiBAC**, (Molecular probes) 15 µg/mL en DMSO
- **MitoSOX** 5 µM en DMSO
- **DAF-FM** 1 µM en DMSO
- **Kit Live/Dead BacLight-viabilidad bacteriana** (Molecular Probes).
Combinación de los fluorocromos Syto-9, fluorocromo que se une a los ácidos nucleicos, penetra en células vivas y muertas y el fluorocromo PI, sonda que penetra en células muertas. Se siguió el protocolo de tinción especificado en el kit comercial.

TABLA 4 Sondas fluorescentes utilizadas en el estudio			
Compuesto fluorescente	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Mecanismo de acción
DCFH-DA	488	520	Detección ROS-peróxidos
DHE	488	567	Detección ROS-superóxido
DHR123	488	520	Detección ROS OH. peróxidos peroxinitrito
DiBAC	488	516	Potencial de membrana plasmático
EB	488	605	Bombas de extrusión Muerte celular
FITC	488	525	Contenido proteínas
HgOr	488	575	Glutación
PI	488	617	Muerte celular
Rojo Nilo	488	520, 636	Lípidos polares y apolares
Syto 9	488	503	Ácidos nucleicos. Células vivas y muertas
DAF-FM	488	510	Detección NO

3. CEPAS BACTERIANAS

Tabla 5 Cepas Bacterianas		
Nº cepa	Especie	Genotipo
IC188	<i>E.coli B</i>	WP2uvrA oxyR+/pKM101
IC203	<i>E.coli B</i>	WP2uvrA Δ oxyR30/pKM101
AB1157	<i>E.coli K-12</i>	E.coli K-12
IC5232	<i>E.coli B</i>	WP2uvrA sodAB- /pKM101
IC5282	<i>E.coli B</i>	Revertiente trp+ IC188
IC5204	<i>E.coli B</i>	Revertiente trp+ IC203
IC2880	<i>E.coli B</i>	WP2 uvrA trp65
IC5267	<i>E.coli B</i>	WP2uvrA gshA20 oxyR+/pKM101

Condiciones de cultivo

Cultivo estacionario

Inocular 10 mL de medio LB con 100 uL de un cultivo criopreservado, incubar 12 horas a 37°C

Cultivo exponencial

Inocular 10 mL de medio LB con 50 uL de un cultivo estacionario, incubar hasta DO600=0,6

Verificación del fenotipo *E.coli B*

Mezclar 100 uL de un cultivo estacionario con 3 mL de molten top agar, sembrar una placa de LA. Inocular con 20 uL del fago C21. Incubar 24 horas a 37°C.

El fenotipo *E.coli B* de la cepa WP2 es sensible a la lisis del fago C21, mientras *E.coli K-12* es resistente.

Verificación genotipo *oxyR*-

Mezclar 100 uL de un cultivo estacionario con 3 mL de molten top agar, sembrar una placa de LA. Poner un disco de papel estéril de 6 mm impregnado previamente con 10 uL de una solución de 1M de peróxido de hidrógeno en la superficie de la placa.

El fenotipo de la cepa *oxyR* mutante se verifica por su sensibilidad al estrés oxidativo. El halo de inhibición del crecimiento en la bacteria será de 25 mm frente a los 11 mm de la cepa salvaje.

Ensayo de citotoxicidad en placa

Cepas

IC5282 WP2 *uvrA trpE*+/*pKM101* (revertiente *trp*+ de IC188)

IC5204 WP2 *uvrA trpE*+ Δ *oxyR30*/*pKM101* (revertiente de IC203)

IC2880 WP2 *uvrA trp*::*Tn10*

El ensayo está basado en el protocolo desarrollado por Waleh *et al* 1982 y usa una mezcla de cepas triptófano+ (*trp*⁺) (células a ensayar) y células no revertientes triptófano- (*trp*⁻) (células de relleno). Las cepas a ensayar fueron IC5282 y 5204, la cepa de relleno fue IC2880.

Se dispone en un tubo estéril 100 μ L de la mezcla bacteriana (conteniendo aproximadamente 800 células de las células a ensayar y 3×10^7 de las células de relleno) se añade a esta mezcla de bacterias 100 μ L de los compuestos a ensayar y 2.5 mL de molten top agar.

La mezcla se siembra en placas de medio E4, incubándose a 37°C 24 horas. El % de supervivencia se calcula con la fórmula: [CFU/placa en cada dosis dividido por CFU a la dosis 0 x 100].

4. ENSAYOS CITÓMICOS PARA EL ESTUDIO DE LAS DIFERENCIA ENTRE *E.coli* K-12 Y *E.coli* B

Permeabilización bacteriana con etanol

Alicuotas de 1 mL de cultivos en fase estacionaria se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante, y se añadió 1mL de etanol al 70%, esta suspensión permeabilizada se mantiene a -20°C 1 hora. Se centrifugó a 3000 rpm y se resuspendió en 1 mL de PBS.

Tanto los cultivos permeabilizados como los controles no permeabilizados se incubaron con FITC (10 µg/mL) durante 15 minutos a 37°C. Se analizó con el citómetro con el protocolo apropiado.

Tratamiento con gramicidina

Alicuotas de 1 mL de cultivos en fase estacionaria se incuban con el antibiótico gramicidina S durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este antibiótico forma poros en la membrana bacteriana, produciéndose un efecto sobre el potencial de membrana plasmática.

Las suspensiones control y tratadas se incubaron con 15 µg/mL durante 10 minutos a 37°C. Se analizó con el citómetro con el protocolo apropiado.

Inhibición de las bombas de eflujo de sondas fluorescentes

Los cultivos en fase estacionaria se diluyeron 1:10 en PBS y se trataron con 80 µg/mL de FCCP durante 30 minutos a 37°C. Células control y tratadas se tiñeron con 10 µg/mL de bromuro de etidio o 10 µg/mL de yoduro de propidio durante 20 minutos a temperatura ambiente, una alícuota de 200 µL se separó para medir la intensidad de fluorescencia en el citómetro, el resto del cultivo se centrifugó y se añadió PBS incubándose 2 horas a temperatura ambiente. Las suspensiones se analizaron por el citómetro con el protocolo apropiado.

Muerte celular inducida por temperatura

Cultivos en fase estacionaria se incubaron en microondas durante 20 segundos a 620mW., se tiñeron con 10 µg/mL de yoduro de propidio durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se analizó con el citómetro con el protocolo apropiado.

Microscopía de fluorescencia

Las condiciones de los cultivos fueron las descritas anteriormente, 10 µL de las suspensiones celulares se analizaron con el microscopio de fluorescencia Axioskop 2 Zeiss.

Ensayos citómicos para el estudio del estrés oxidativo.

Medida del nivel intracelular de peróxidos y superóxido

Para someter al cultivo a condiciones aróxicas, se utilizan cultivos creciendo en fase exponencial DO₆₀₀ 0.6.

Tratamiento con compuestos prooxidantes

Los cultivos bacterianos se trataron durante 30 minutos a 37°C con concentraciones de H₂O₂ [0-25-50-100-200 mM]

Los cultivos bacterianos se trataron durante 60 minutos a 37°C con concentraciones de *Tert*-butilhidroperóxido [0-10-25 mM]; plumbagina [0-20-30-40-60 µg/mL]; menadiona [0-50-100-200-400 µg/mL]; paraquat [0-100-200-400 µg/mL]

Los cultivos tratados con los pro-oxidantes se centrifugaron y se resuspendieron en PBS estéril. Se diluyó la muestra 1:10 en PBS estéril. 500 µL de la dilución 1:10 se incubó durante 15 minutos con los fluorocromos a las siguientes concentraciones: DCDHF-DA 10 µg/mL, DHE 10 µg/mL DHR123 1 µg/mL, PI, EB 10 µg/mL. Se analizó con el citómetro de flujo Coulter EPICS –XL/Cytomics FC500

Medida de nivel intracelular de Glutación

500 µL de cultivos tratados con los diferentes pro-oxidantes se centrifugaron 10 minutos a 3000 rpm y se resuspendieron en 100 µM de la solución de naranja de mercurio (HgOr), se incubaron durante 60 minutos a 4°C, se centrifugaron y se resuspendieron en 500 µL de PBS estéril. Se analizó con el citómetro de flujo Coulter EPICS –XL

Ensayos citómicos en tiempo real (*In fluxo*) para el estudio del estrés oxidativo

Los cultivos de las cepas a ensayar se tiñeron con DHR123 durante 10 minutos a 37°C. Se analizan la muestra en el citómetro durante unos segundos (nivel basal), se detiene la adquisición y se le añade los compuestos oxidantes (H₂O₂) y se adquiere la muestra 5 minutos. Por otro lado para generar el radical hidroxilo (OH[•]) se añade 50mM de H₂O₂ y una solución de 50 µg/mL de acetato de cobre. Se adquiere la muestra en el citómetro de flujo Cytomics FC500 durante 5 minutos.

Análisis citométrico

Los ensayos funcionales descritos se llevaron a cabo con un citómetro de flujo EPICS-XL-MCL (Beckmann Coulter) con un laser azul 488 (15mW), este citómetro está equipado con 2 detectores para la morfología celular: dispersión frontal FSC, tamaño celular; dispersión lateral SSC granularidad/complejidad celular, y cuatro detectores para detectar fluorescencia: fluorescencia verde FL1, 525 nm; para FITC, DiBAC, DHDCF-DA, DHR123 y la fluorescencia verde del rojo nilo), amarillo (FL2, 575 nm; para DHE), naranja FL3, 620 nm; para PI y HgOR y roja (FL4, 675 nm; para la fluorescencia roja del rojo nilo. Para evitar coincidencias la velocidad de flujo fue 200-300 eventos/segundo, y se adquirió 10000 eventos/muestra.

Los datos se guardaron como archivos "listmode" y se analizaron con el software de análisis System II V.3 software (Beckman-Coulter).

Los ensayos de estrés oxidativo se realizaron en un citómetro Beckmann Coulter FC500. Este citómetro tiene dos láseres, azul

488nm y rojo 633nm, está equipado con 2 detectores para la morfología celular: dispersión frontal FSC, tamaño celular; dispersión lateral SSC granularidad/complejidad celular, y cinco detectores para fluorescencia: FL1 525nm; FL2 575nm; FL3 610nm; FL4 675; FL5 755nm. Las condiciones experimentales son las mismas que que para el citómetro EPICS XL. Los datos se analizaron con el software de análisis CXP (Bekmann Coulter).

Ensayos con la línea de neuroblastoma humana SH-SY5Y

Cultivos celulares

SHSY5Y Línea celular de neuroblastoma humano obtenida de ECACC (no 94030304; Salisbury, UK).

Medio de cultivo

DMEM conteniendo 15% de suero bovino fetal. 1% aminoácidos no esenciales, 2 mM L-glutamina, 100 IU/mL penicilina, and 100 µg/mL estreptomicina.

Medio de cultivo para tratamiento

DMEM conteniendo 5% de suero bovino fetal (FBS). 1% aminoácidos no esenciales, 2 mM L-glutamina, 100 IU/mL penicilina, and 100 µg/mL estreptomicina.

Protocolo experimental del tratamiento de SH-SY5Y

Se sembraron 2.7×10^4 células en una placa de 96 pocillos y se incubaron en incubador 37°C al 5% de CO₂ con el medido de cultivo al 15% de suero durante 24 horas (confluencia 50%).

Se retiró el medio y se incubaron las células con los compuestos a ensayar diluidos en medio de tratamiento al 5% de FBS durante 24 horas a 37°C 5% de CO₂.

Se tripsinizaron y se resuspendieron en medio de cultivo al 5% de FBS. Se añadieron los distintos fluorocromos: PI (2.5 µg/mL), MitoSOX (1.25 µM) incubándose durante 15 minutos a 37°C y posterior medida con el citómetro de flujo.

Detección de los niveles de caspasa 3

Se aplica el protocolo del Kit *Cleaved caspase 3(Asp-175) Antibody (Alexa 488)* de Cell Signalling Technology a células control y tratadas.

Experimentos de rango de dosis de los compuestos derivados del tideglusib

Para cada compuesto, un rango de dosis se ensayó para poder cuantificar su citotoxicidad y poder definir un rango de concentraciones apropiado en los experimentos en los que se medía los niveles de ROS.

El rango de dosis se llevó hasta el límite de solubilidad de cada compuesto, se calculó con la ayuda del programa Phototox (<http://www.oecd.org/dataoecd/18/18/33969252.zip>) el valor de IC50 (concentración inhibitoria que produce la muerte del 50% de la población), el ensayo de citotoxicidad se realizó con el kit de viabilidad Live Dead BacLight (Life Technology). Cuando no se observaba muerte celular a la máxima dosis permitida por la solubilidad del compuesto, IC50 se señalaba como mayor que esa concentración. El control positivo en el ensayo de citotoxicidad fue el isopropil alcohol, el control negativo fueron los cultivos bacterianos incubados con el solvente de los compuestos, el % de muerte en cultivos sin tratar no podría ser > 10%. El control positivo para ensayos de estrés oxidativo fue el cumenehidroperóxido (CHP).

Detección y cuantificación del estrés oxidativo

Se utilizaron cultivos en crecimiento exponencial ($DO_{600}=0.3$) en medio LB. Alícuotas de 100 μ L de este cultivo conteniendo 2×10^6 bacterias se dispusieron en una placa de 96 pocillos se incubaron durante 30 minutos a 37°C con las concentraciones apropiadas de los compuestos a ensayar y con los controles positivos. El rango de concentración de cada compuesto se determinó ensayando 5 concentraciones hasta la concentración IC50 determinada previamente en los ensayos de citotoxicidad.

Para la detección y cuantificación de los biomarcadores de estrés oxidativo, las suspensiones de *E.coli* se teñían con los fluorocromos DHDCF-DA, para determinar la actividad peroxidativa y HE para determinar el nivel intracelular del anión superóxido.

Los análisis citométricos se realizaron en un citómetro Cytomics FC500 (Beckmann Coulter). Todos los experimentos se realizaron por triplicado, con tres réplicas por experimento.

Ensayo en disco de la inhibición de crecimiento en placa

Las diferentes cepas bacterianas se sembraron en placas de LA, discos de papel de 6 mm impregnados con 50 μ g/disco de cada compuesto se depositaron en la superficie de las placas. La inhibición del crecimiento alrededor del filtro (halo) se midió tras incubación de las placas durante 24 horas a 37°C.

RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

1. EVALUACIÓN DE *Escherichia coli* K-12 Y *Escherichia coli* B PARA EL DESARROLLO DE ENSAYOS FUNCIONALES POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

La cepa bacteriana *E.coli* K-12 pierde completamente el O polisacárido, y la cepa *E.coli* B pierde además la parte más distal del core (Jansson *et al* 1981). *E.coli* B ha sido ampliamente utilizada en ensayos de mutagénesis, y está incluida en la guía oficial para ensayos de mutagénesis (OECD guideline for testing of chemicals, test 471: Bacterial reverse mutation test). Esta cepa presenta una permeabilidad incrementada frente a compuestos xenobióticos que, en muchos casos presentan estructuras químicas similares a las de las sondas fluorescentes empleadas habitualmente en estudios citométricos: compuestos de bajo o medio peso molecular, con uno o varios anillos aromáticos y con grupos polares, (Herrera *et al* 1993; Plesiat *et al* 1999 Allman 1990). Este fenómeno nos llevó a pensar que la cepa *E.coli* B podría utilizarse en estudios de función celular por citometria de flujo si previamente confirmamos su permeabilidad conveniente a moléculas fluorescentes de relevancia.

En la primera parte de este trabajo hemos evaluado la aplicabilidad de la cepa mediante el uso de tinciones con sondas fluorescentes para la detección de componentes generales intracelulares (proteínas y lípidos) y para la medida de aspectos funcionales, como la viabilidad, el potencial de membrana plasmática y los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Los estudios se realizaron en condiciones basales así como

tras la inducción y modulación del estrés oxidativo con diferentes moléculas prooxidantes y antioxidantes.

1.1 Caracterización de la permeabilidad de las cepas *E.coli* B y *E.coli* K-12 por microscopía de fluorescencia.

La verificación con el bacteriófago C21 confirmó que *E.coli* B tiene su LPS alterado, ya que es más permeable que la cepa *E.coli* K-12. Para estimar la posible asociación entre el incremento en permeabilidad y una mayor eficiencia en la tinción con los fluorocromos descritos previamente, ambas cepas se incubaron sin tratamientos permeabilizantes con los siguientes fluorocromos: FITC, una sonda fluorescente que se une a proteínas y que no atraviesa la membrana plasmática (Williams *et al* 1999), o Nile Red (NR), un fluorocromo metacromático con afinidad para lípidos celulares (Greenspan *et al* 1985; Santilliet *et al* 1989; Spiekermann *et al* 1999) y se observaron en el microscopio de fluorescencia (Figura 9A-D.)

E.coli B muestra un mayor porcentaje de células teñidas, así como una mayor intensidad en la fluorescencia que *E.coli* K-12 para ambos fluorocromos. En el caso del NR sólo la fluorescencia roja que se debe a la interacción de la sonda con los lípidos polares de membrana (Santilli *et al* 1989) y los niveles intracelulares de ácidos polihidroxicanoico son detectados (Spiekermann *et al* 1999). La fluorescencia verde del NR debida a la unión de la sonda con los lípidos no polares no se detecta en ninguna de las dos cepas (datos no mostrados).

Estas observaciones sugieren que la mayor eficiencia en la penetración de las sondas fluorescentes a través de la membrana externa se debe a una mayor permeabilidad de la cepa de *E.coli*B

Ya que la integridad de la membrana tiene una función crucial en la permeabilidad a sondas fluorescentes, se comparó los niveles basales de fluorescencia de ambas cepas teñidas con dos fluorocromos utilizados en la evaluación del estado estructural y funcional de las membranas de eucariotas y procariontes. DiBAC es una sonda aniónica sensible al potencial de membrana que penetra fácilmente a través de membranas despolarizadas y se retiene por proteínas intracelulares. PI es una sonda que atraviesa membranas plasmáticas dañadas y se considera un indicador de la muerte celular. Ambos fluorocromos se han utilizado en estudios de integridad bacteriana tanto en condiciones fisiológicas como tóxicas (Lopez-Amoros *et al* 1997; Hewitt *et al* 1999). Como se muestra en la Figura 9 E,F, *E.coli* B muestra un incremento en el nivel de fluorescencia del DiBAC con respecto a *E.coli* K-12 tanto en el número de células teñidas como en la intensidad de fluorescencia de las bacterias. Este incremento de fluorescencia no es debido a una despolarización de la membrana de *E.coli* B, ya que la estructura de la membrana plasmática no está modificada en esta cepa. Si el potencial de membrana es similar en ambas cepas ambas deberían mostrar una respuesta similar al agente despolarizante gramicidina S, un antibiótico polipeptídico que suprime el potencial de membrana en células eucariota y procariontes (Katsu *et al* 1986). Como se muestra en la Figura 9 G,H el tratamiento con gramicidina S produce altos niveles de fluorescencia en ambas cepas, confirmando la

hipótesis de que la modificación en la membrana externa y no la diferencia en el potencial de membrana es la responsable de una mayor entrada del fluorocromo DiBAC en *E.coli* B. La tinción con PI fue similar en ambas cepas, encontrándose un bajo número de células positivas para PI en condiciones basales (Figura 9 I,J), confirmando que *E.coli* B en condiciones basales no presenta cambios en la integridad de su membrana plasmática. Cuando se somete a los cultivos bacterianos a un tratamiento térmico para inducir la muerte, se observa un incremento en la fluorescencia en ambas cepas (Figura 9 K,L).

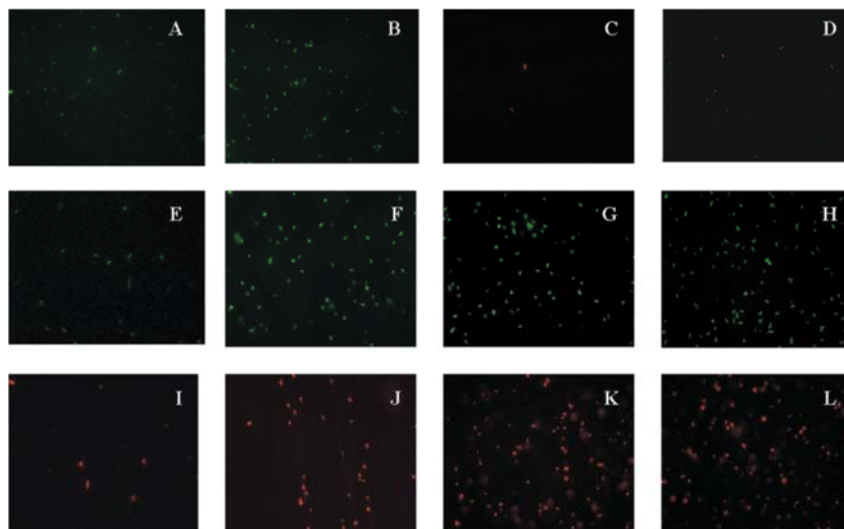


Figura 9. Microscopía de fluorescencia de *E.coli* K-12 y *E.coli* B. Cepas *E.coli* K-12 AB1157 (A,C,E,G,I,K) y *E.coli* B IC188(B,D,F,H,J,L) teñidas con FITC, NR, DiBAC, PI. A,B: FITC en condiciones basales, C,D: Rojo Nilo en condiciones basales, E,F: DiBAC en condiciones basales, G,H: DiBAC tratadas con gramicidina S, I,J: PI en condiciones basales, K,L: cultivos sometidos a choque térmico en microondas. En todos los casos las preparaciones bacterianas contienen el mismo número de células.

1.2 Evaluación por citometría de flujo de la tinción fluorescente de las cepas de *E.coli* B y *E.coli* K-12

Después de la caracterización del comportamiento de la tinción de ambas cepas se aplicó la CMF para la valoración de las diferencias entre ambas cepas en las mismas condiciones experimentales, es decir utilizando los fluorocromos descritos anteriormente y sin proceder a la permeabilización de los cultivos.

En la Figura 10 se muestra las características morfológicas de FSC vs SSC de ambas cepas (Figura 10 A, B). Estos histogramas muestran una distribución morfológica similar en ambas cepas, relacionada con la asimetría de la bacteria que atraviesa el láser por su forma de bacilo (Hewitt *et al* 2001). Los niveles de autofluorescencia verde son similares en ambas cepas (Figura 10C), sugiriendo que tienen un contenido intracelular de flavinas comparable (Thorell *et al* 1983).

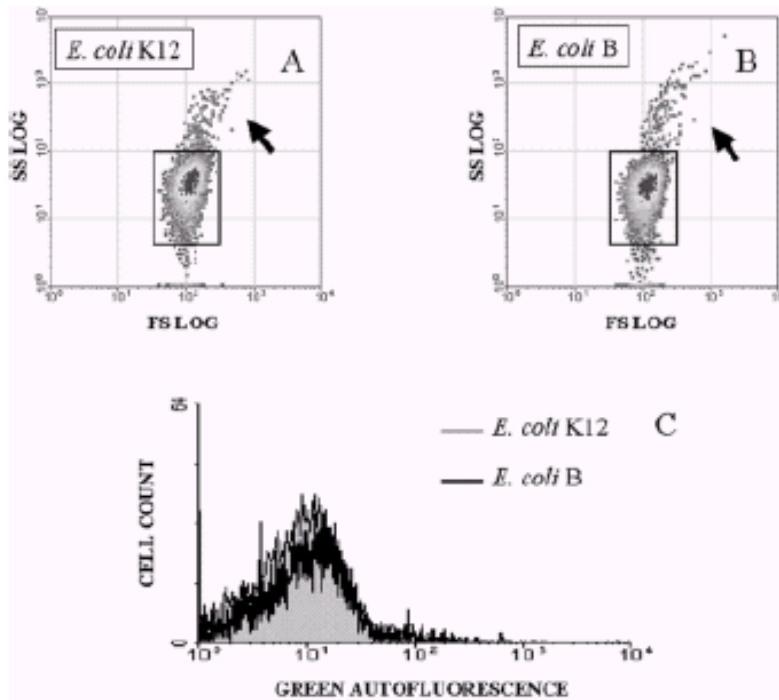


Figura 10 Características citométricas de morfología y autofluorescencia de *E.coli* K-12(AB1157) y *E.coli* B (IC188). A,B Histogramas biparamétricos de FSC vs SSC de AB1157 e IC188 respectivamente. Las flechas indican la presencia de agregados y la zona acotada por el rectángulo representa la selección de la población que se analiza para detectar los niveles de autofluorescencia. C: Comparación de la autofluorescencia verde de ambas cepas.

La Figura 11 muestra resultados representativos de las distribuciones citométricas de la tinción fluorescente de ambas cepas. *E.coli* B presenta un pequeño incremento en la distribución fluorescente del fluorocromo FITC con respecto a *E.coli* K-12 (Figura 11A) en condiciones basales. Después de la fijación con etanol, la fluorescencia de FITC se incrementó en ambas cepas con respecto a los controles no

fijados, siendo esta fluorescencia similar en *E.coli* B y *E.coli* K-12 indicando un contenido en proteínas totales similar en ambas cepas (Figura 11B).

En la tinción con NR, en concordancia con los resultados de la microscopía de fluorescencia, ambas cepas presentaban un nivel similar de fluorescencia verde (Figura 11C). El componente rojo de NR fue mayor que el componente verde en ambas cepas, consistente con la interacción con los lípidos polares de la membrana. La cepa *E.coli* B mostraba una fluorescencia roja más intensa y homogénea que la cepa *E.coli* K-12 (Figura 11D). Esta cepa presenta una distribución bimodal de la fluorescencia roja sugiriendo una heterogeneidad la estructura o en la composición lipídica de su membrana.

La integridad de la membrana fue evaluada con PI en condiciones basales y tras someter a los cultivos de ambas cepas a un choque térmico en un microondas (Figura 11 G, H). Las dos cepas contenían un bajo porcentaje de células muertas en condiciones basales, pero al ser sometidas al choque térmico el nivel de células PI+, relacionado con muerte celular, fue similar en *E.coli* B y *E.coli* K-12.

Para cuantificar los efectos sobre el potencial de membrana plasmática, ambas cepas se tiñeron con DiBAC en condiciones basales (Figura 11E) y tras 30 minutos de tratamiento con gramicidina S (Figura 11F). En estas condiciones el antibiótico no inducía muerte celular (datos no mostrados). La citometría de flujo confirmó el incremento intrínseco de la fluorescencia de DiBAC observada por microscopía de fluorescencia en *E.coli* B con respecto a *E.coli* K-12, después del tratamiento con gramicidina S ambas cepas presentaron un

incremento, dependiente del tiempo de tratamiento, de la intensidad de fluorescencia del DiBAC (Figura 12), siendo este incremento mayor en la cepa *E.coli* B. Sin embargo el incremento relativo respecto a su nivel basal en la fluorescencia de DiBAC a lo largo del tiempo fue similar en ambas. Por lo tanto, dado que la sensibilidad a gramicidina S es comparable en ambas cepas, se deduce que la modificación en la composición de la membrana externa, y no una diferencia en el potencial de membrana, es la responsable del aumento en la permeabilidad de *E.coli* B al fluorocromo DiBAC.

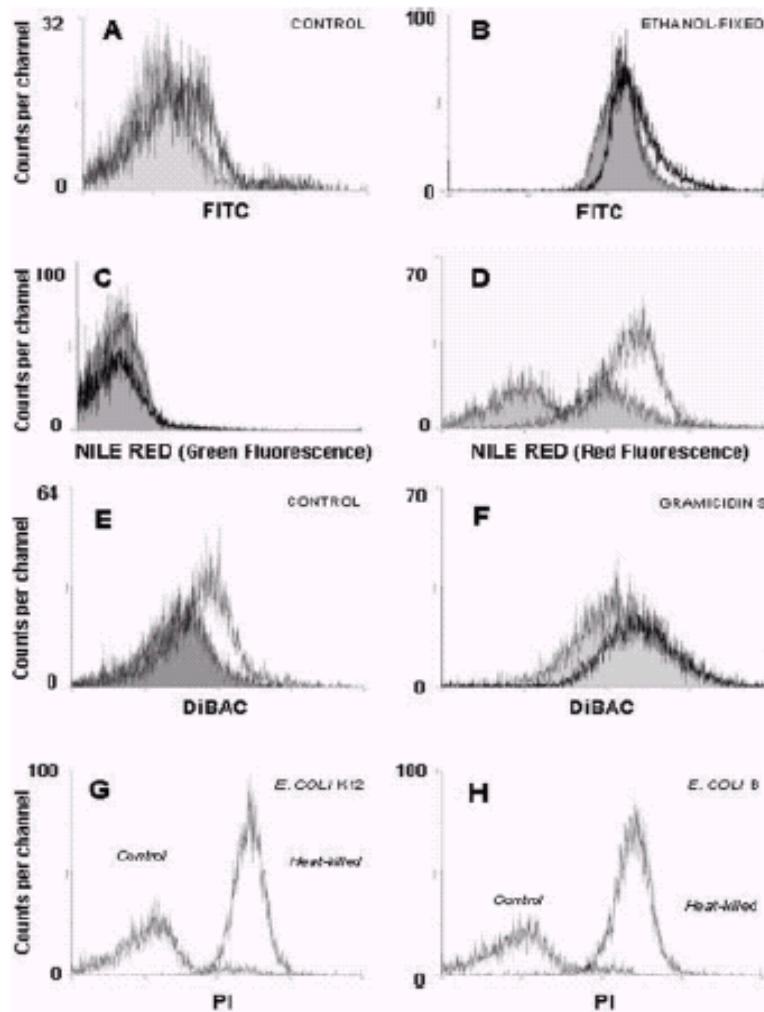


Figura 11. Incorporación de fluorocromos en *E.coli* K-12 (AB1157) y *E.coli* B (IC188). Los cultivos se tiñeron y trataron como se indica en Metodología. Los histogramas en gris representan a *E.coli* K12, en blanco *E.coli* B. Los paneles muestran histogramas representativos de FITC en condiciones basales (A), o tras fijación con etanol (B); fluorescencia verde (C) o fluorescencia roja del rojo nilo (D) en condiciones basales; fluorescencia de DiBAC en condiciones basales (E) y los cultivos tratados con gramicidina S (F); muerte celular detectada con yoduro de propidio (PI) en condiciones basales y después de choque térmico en *E.coli* K-12 (G) y *E.coli* B (H).

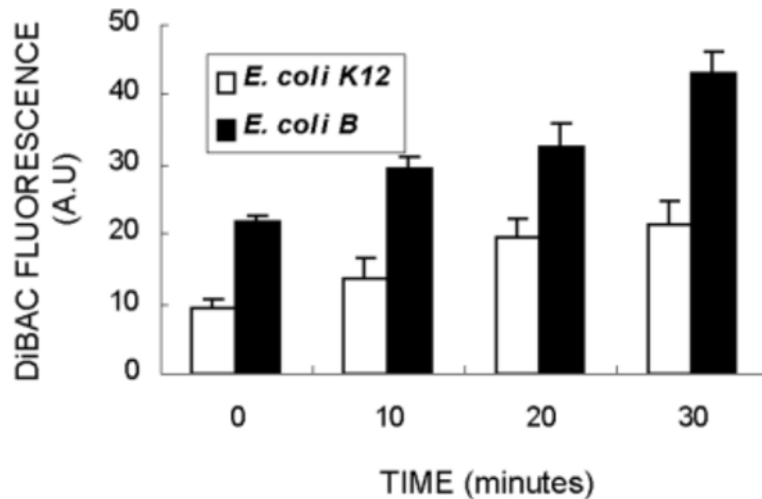


Figura 12 Efecto de la pérdida del potencial de membrana plasmático en *E.coli* K-12 y *E.coli* B. Los cultivos bacterianos se trataron con gramicidina S y se tiñeron con DiBAC como se describe en Metodología. Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos.

1.3. Comparación por citometría de flujo del eflujo de fluorocromos en cepas *E.coli* K-12 y *E.coli* B

Para evaluar la diferencia en la extrusión de sondas fluorescentes entre las dos cepas *E.coli* B y *E.coli* K-12, se comparan las dos cepas tratadas con el desacoplador FCCP y se utiliza el bromuro de etidio (EB) y el yoduro de propidio (PI) como sondas a ensayar. La tinción con bromuro de etidio en ambas cepas es baja en condiciones control (Figura 13 A,B). El pretratamiento con FCCP dio lugar a un incremento en la fluorescencia de EB similar en ambas cepas y este efecto fue reversible. Después de la eliminación de FCCP, la fluorescencia de EB volvió a ser ligeramente superior en ambas cepas a los niveles de las células sin tratar. El efecto del FCCP sobre la extrusión de PI se realizó en ambas cepas con el mismo procedimiento experimental. Al

contrario que con el EB el FCCP inducía un menor transporte del PI al interior de la célula, produciéndose de manera similar en ambas cepas (Figura 13C, D), aunque los efectos de FCCP fueron ligeramente más altos en *E.coli* B. Estos datos sugieren que las bombas de extrusión están presentes y son funcionales en ambas cepas, como se demuestra por el comportamiento de la bomba de extrusión del EB en presencia de FCCP, un inhibidor establecido de transporte de sondas fluorescentes (Jernaes et al 1994).

Ya que ambas cepas se comportan de manera similar en la respuesta a FCCP, una extrusión diferencial de sondas se descarta para explicar las diferencias en la tinción con sondas fluorescentes. Los pequeños cambios que se producen en el transporte del PI al interior de la célula confirman que la membrana plasmática está intacta tras el tratamiento con FCCP.

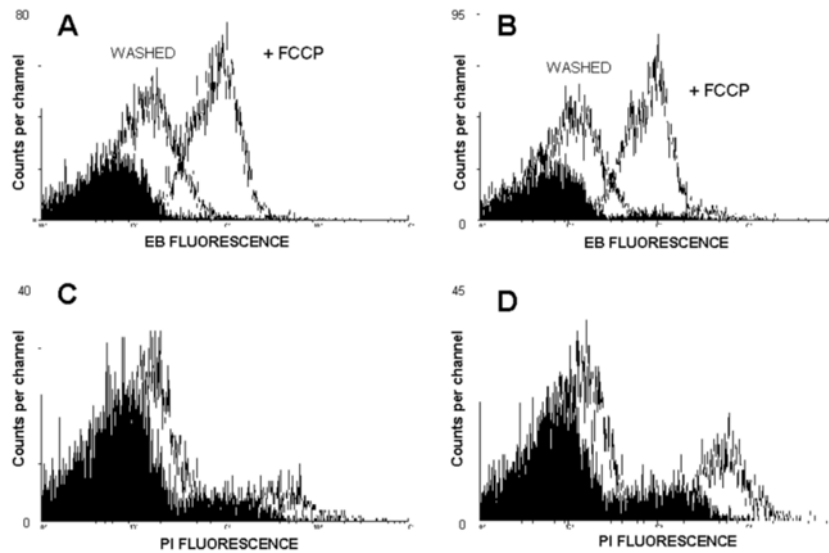


Figura 13 Efecto del inhibidor metabólico FCCP sobre el eflujo del bromuro de etidio (EB) y el yoduro de propidio (PI) en *E.coli* K-12 y *E.coli* B. Los histogramas de *E.coli* K-12 (A,C) y *E.coli* B (B,C) A,B: fluorescencia del bromuro de etidio EB (FL2). Los histogramas en negro son los niveles basales, en blanco corresponden a a cultivos tratados durante 2h con FCCP (+FCCP), y dos horas después se procede a retirar el inhibidor y el bromuro de etidio (washed). C,D: fluorescencia de yoduro de propidio PI (FL3). Los histogramas en negro son los niveles basales, en blanco corresponden a cultivos tratados durante 2h con FCCP.

1.4. Análisis por citometría de flujo de la tinción con sondas fluorescentes de las cepas *E.coli* K-12 y *E.coli* B en condiciones de estrés oxidativo

En otra serie de experimentos la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) en ambas cepas se evaluó por citometría de flujo. El estrés oxidativo se generó por tratamientos con dos pro-oxidantes H_2O_2 , como generador de peróxido; y plumbagina como

generador de $O_2^{\cdot-}$ utilizando para detectar estas ROS dos sondas fluorescentes DHDCF-DA para detectar peróxidos y HE para detectar $O_2^{\cdot-}$ (Rothe *et al* 1990; Tarpey *et al* 2001). La Figura 14A muestra la curva dosis respuesta de la fluorescencia DHDCF tras incubación con H_2O_2 exógeno *E.coli* K-12 no presentó un incremento significativo en la fluorescencia cuando se sometió a las concentraciones de H_2O_2 ensayadas, mientras que *E.coli* B presentó una alta respuesta dosis dependiente a este oxidante. Dentro de estas condiciones la medida de la muerte celular fue menor del 20% de células muertas en ambas cepas. Estos resultados sugieren que en *E.coli* B hay una mejor eficiencia de tinción con DHDCF más que un incremento en la sensibilidad a H_2O_2 .

La Figura 14B muestra la curva dosis-respuesta de la generación de $O_2^{\cdot-}$ por plumbagina y detectado por la oxidación de HE a etidio. De nuevo la cepa *E.coli* B es más eficiente que la cepa *E.coli* K-12 para revelar la presencia de superóxido con HE. La muerte celular, detectada con PI, a la máxima dosis ensayada fue menor del 20% en ambas cepas.

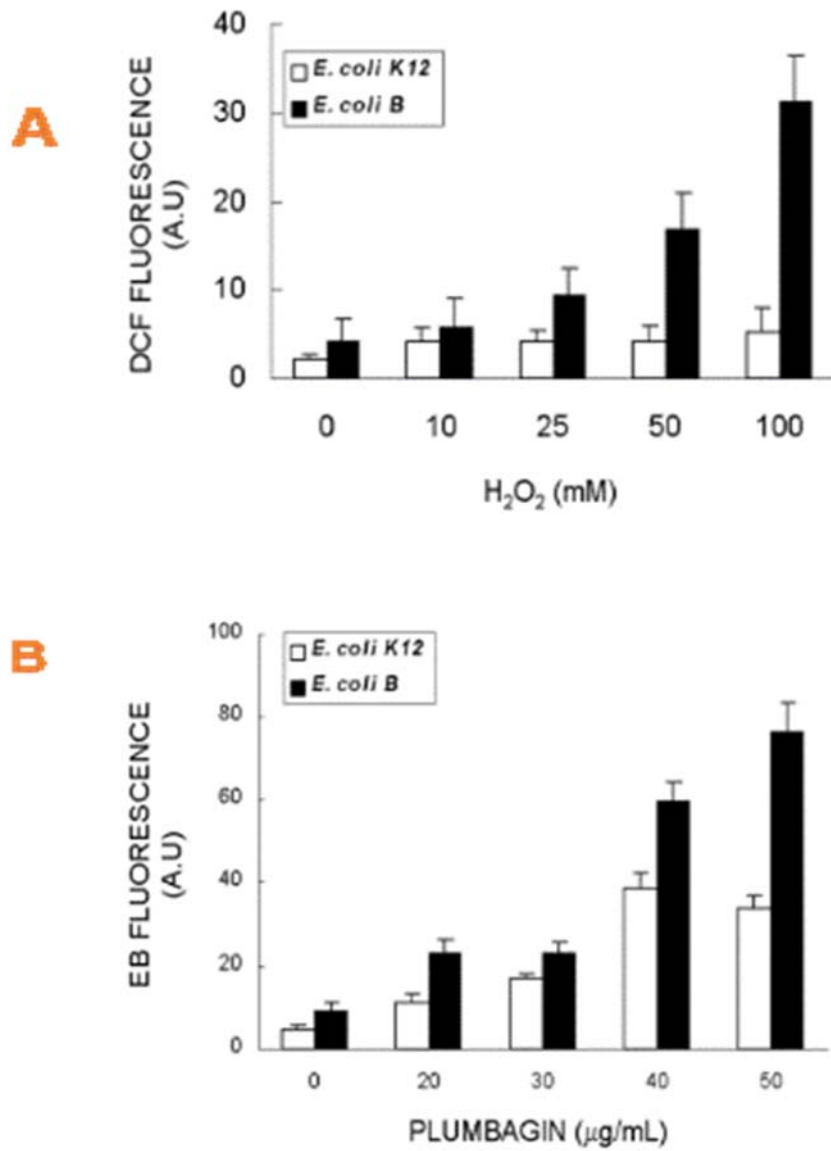


Figura 14. Efecto del tratamiento con oxidantes sobre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). **A** Generación de peróxidos intracelulares tras tratamiento con H₂O₂ y tinción con DHDCF-DA como se describe en Metodología. **B** Generación de superóxido intracelular tras tratamiento con plumbagina y tinción con HE como se describe en Metodología. Los resultados son la media ± SD de tres experimentos.

El uso de la CMF en estudios funcionales requiere células permeables a los fluorocromos (O'Connor *et al* 2001). Estamos interesados en la aplicación de la citometría de flujo a estudios fisiológicos y toxicológicos de sistemas bacterianos basados en cepas de *E.coli* con modificaciones en genes específicos relacionados con el estrés oxidativo (Urios *et al* 1998; Martínez *et al* 2000; Blanco *et al* 1998). Este sistema no implica protocolos de permeabilización que puedan afectar artefactualmente a la bioquímica intracelular o reducir la aplicabilidad de los ensayos funcionales dentro de las condiciones experimentales (por ejemplo el análisis de fenómenos rápidos o transitorios).

E.coli B es una cepa ampliamente utilizada en estudios toxicológicos y está específicamente recomendada en estudios de test de mutagenicidad (test de "bacterial reverse mutation" incluido en la Organization for Economic Cooperation and Development [OECD] Guideline for Testing of Chemicals). Su alta permeabilidad a toxinas hace a esta cepa particularmente útil para ensayos de efectos intracelulares de compuestos que de otra forma serían inaccesibles a células menos permeables.

Los resultados presentados en este estudio indican que las dos cepas de *E.coli* con diferente permeabilidad en su membrana muestran diferente comportamiento con la serie de fluorocromos ensayados. Los análisis de microscopía de fluorescencia y CMF indican que en condiciones basales la cepa de *E.coli* B presenta una mayor eficiencia en el transporte de las sondas fluorescentes que la cepa *E.coli* K-12.

Los análisis realizados para detectar presencia y funcionalidad de bombas de extrusión de sonda fluorescentes ponen en evidencia que la cepa de *E.coli* B posee un sistema de extrusión similar al de *E.coli* K-12. También presenta *E.coli* B una membrana plasmática funcional ya que reponde de manera similar a *E.coli* K-12 a la despolarización por desacopladores como el FCCP. En cuanto al estudio de sondas relacionadas con el estrés oxidativo se ha comprobado que la cepa de *E.coli* B es más eficiente que *E.coli* K-12 en la tinción con fluorocromos como DCDHF-DA y HE, respondiendo a dosis bajas de pro-oxidantes de manera más sensible y puede ser una cepa indicada en el estudio tanto de compuestos pro-oxidantes como antioxidantes, por lo que esta cepa puede estar indicada en el desarrollo de bioensayos de estrés oxidativo por CMF.

2. DISEÑO DE UN MODELO DE BIOSENSORES BACTERIANOS PARA DETECTAR ESTRÉS OXIDATIVO POR CITOMETRÍA DE FLUJO MEDIANTE EL USO DE CEPAS BACTERIANAS DEFICIENTES EN GENES DE LA DEFENSA ANTIOXIDANTE

En nuestro laboratorio disponemos de una colección de cepas isogénicas derivadas de *E.coli* B *uvrA* que son deficientes en diferentes vías de la respuesta antioxidante de *E.coli*. Como se ha descrito en la Introducción, *E.coli* tiene dos regulones importantes que se inducen cuando se expone la bacteria a compuestos pro-oxidantes, OxyR y SoxRS que, a su vez, controlan varios genes de la defensa antioxidante.

Tras haber demostrado la aplicabilidad de la cepa *E.coli* B para estudios de citometría de flujo basados en fluorescencia, nos planteamos diseñar un modelo experimental bacteriano para el estudio experimental del estrés oxidativo. Para ello hemos estudiado el efecto que la introducción de mutaciones en los genes *oxyR*, *sodA*, *sodB* y *gshA* tiene sobre la generación de radicales libres cuando las bacterias se someten a diferentes pro-oxidantes. Esta serie de experimentos se llevó a cabo por citometría de flujo utilizando sondas fluorescentes específicas para diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS).

2.1 Estudio de mutantes en el Regulón OxyR.

Como se muestra en el apartado de Introducción de esta Tesis, el regulón OxyR controla la respuesta frente a los peróxidos y regula positivamente genes tan importantes en la defensa antioxidante como la catalasa, alquil-hidroperoxido reductasa (Tabla 2).

En la Tabla 6 se compara la sensibilidad al estrés oxidativo de la cepa salvaje (IC188) y la cepa mutante en el gen *oxyR* (IC203). Esta mutación se realizó en el laboratorio de Genética microbiana por el Dr. Manuel Blanco, produciéndose una delección en dicho gen. El fenotipo de este mutante se caracteriza por una extremada sensibilidad al peróxido de hidrógeno, así como una hipermutabilidad espontánea (Blanco et al 1995). En la Tabla 6 se puede observar que la cepa deficiente en el gen *oxyR* presentaba una mayor inhibición del crecimiento cuando se exponía a oxidantes como el peróxido de hidrógeno, cumene hidroperóxido o menadiona.

TABLA 6. Sensibilidad de la cepa IC188, IC203 a oxidantes exógenos en el Test de inhibición de crecimiento				
Cepa	Genotipo	Halo de inhibición (mm)		
		H ₂ O ₂	Menadiona	Cumene hidroperóxido
IC188	<i>uvrA oxyR+</i>	17	21	9
IC203	<i>uvrA ΔoxyR</i>	31	30	34

En la Figura 15A se presentan los resultados de la producción intracelular de peróxidos por la exposición de la cepa salvaje (IC188) y mutante en el gen *oxyR* (IC203) a la acción de H₂O₂. Los resultados muestran un incremento en los niveles de peróxidos detectados con la sonda fluorescente DHDCF-DA. Este fluorocromo no emite fluorescencia en estado reducido cuando se excita con el láser azul (488nm), si el fluorocromo se oxida por la acción de un incremento de los niveles intracelulares de peróxidos, el fluorocromo emite fluorescencia verde. Por lo tanto, como se muestra en la Figura 15A el

mutante *oxyR* (IC203) produce una mayor cantidad de péroxidos cuando se trata con H_2O_2 comparado con la cepa salvaje (IC188).

En la Figura 15B se observa la producción de peróxidos utilizando otro agente oxidante como el *tert*butilhidroperóxido. De nuevo la cepa IC203 produce un mayor nivel de peróxidos que la cepa IC188.

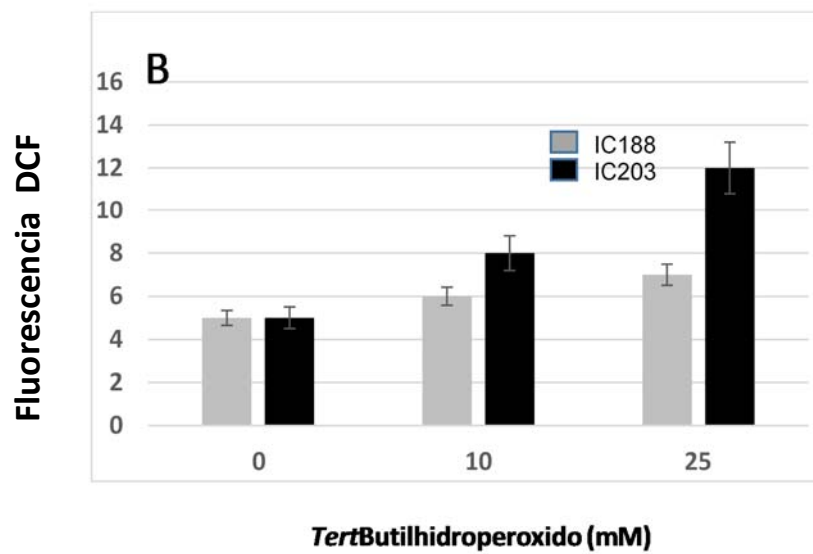
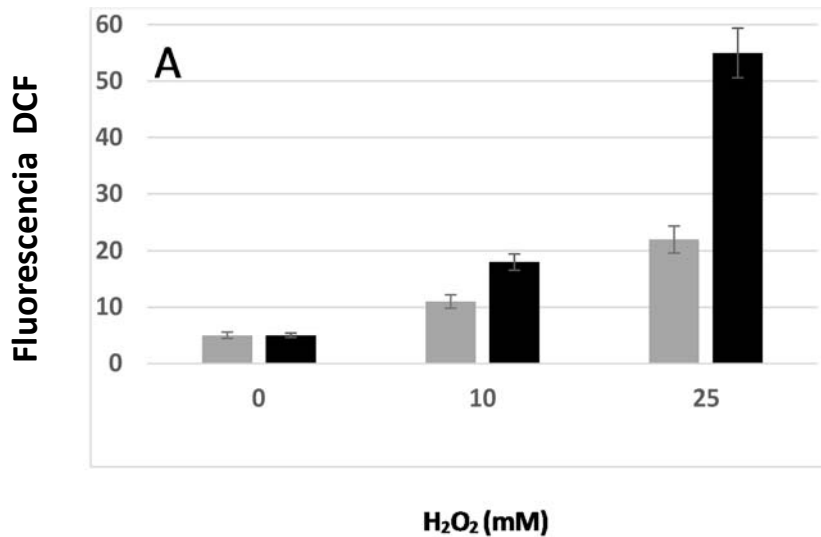


Figura 15. Nivel intracelular de peróxidos en cepas wild-type (IC188) y *oxyR*- (IC203). A Los cultivos bacterianos se trataron con H_2O_2 B Los cultivos bacterianos se trataron con *tert*-butilhidroperóxido. Los niveles de peróxido se determinaron con la sonda fluorescente DHDCF-DA.

En la Figura 16 se muestra los niveles de $O_2^{\cdot -}$ con la sonda fluorescente HE. Esta sonda no es fluorescente en un ambiente celular reducido, en presencia del ión superóxido se oxida y se transforma en etidio. Por lo tanto el incremento en la fluorescencia del etidio tiene una relación con el aumento de la presencia intracelular del ión superóxido. En la Figura 16 se observa de nuevo que el mutante en el gen *oxyR* (IC203) tratado con H_2O_2 genera un mayor nivel intracelular de $O_2^{\cdot -}$ que la cepa salvaje (IC188).

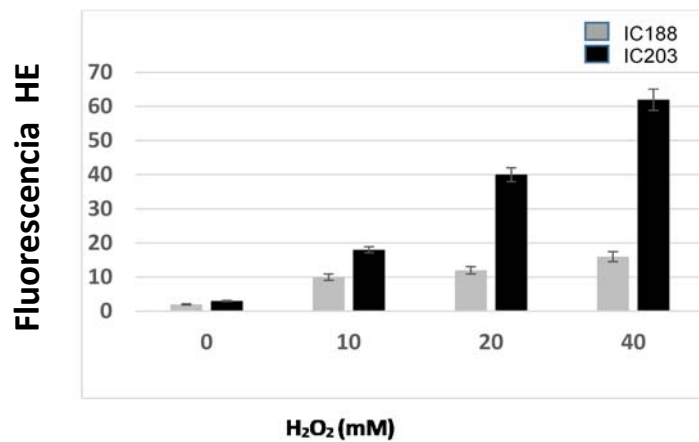


Figura 16 Nivel intracelular de superóxido en cepas wild-type (IC188) y *oxyR*- (IC203) tratadas con H_2O_2 . Los cultivos fueron tratados con H_2O_2 y teñidos con HE como se indica en Metodología. Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos.

En la Figura 17 se presenta la detección de los niveles intracelulares de glutatión. Las cepas IC188 e IC203 tratadas con H_2O_2 se fijan con una solución de naranja de mercurio (HgOr). Este compuesto aumenta su fluorescencia al unirse a tioles libres, por lo que el aumento en la

fluorescencia está directamente relacionada con la presencia de un mayor nivel de GSH intracelular (O'Connor *et al* 1998). En la Figura 17 se observa cómo a nivel basal las dos cepas de estudio IC188 e IC203 tienen niveles diferentes de GSH, la cepa mutante presenta 3 veces menos fluorescencia para el HgOr que la cepa salvaje. Esta disminución en los niveles basales de GSH indica una menor concentración intracelular de GSH. Los cultivos tratados con H₂O₂ presentan una disminución en los niveles de GSH tanto en la cepa IC188 como en la cepa IC203.

Estos datos confirman que el estrés oxidativo se produce drásticamente en la cepa mutante para el gen *oxyR*-, ya que se observa un incremento en las distintas ROS y una disminución en los niveles de la molécula antioxidante GSH.

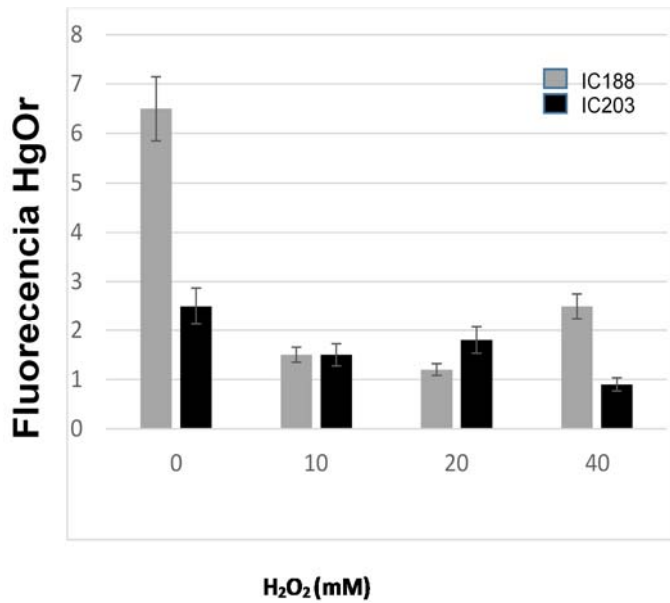


Figura 17 Nivel intracelular de glutatión en cepas wild-type (IC188) y oxyR- (IC203) tratadas con H₂O₂. Los cultivos fueron tratados con H₂O₂ y teñidos con HgOr como se indica en Metodología. Los resultados son la media ± SD de tres experimentos.

En este estudio exhaustivo del estrés oxidativo en *E.coli* y los radicales libres generados por diferentes pro-oxidantes, se realizaron ensayos para detectar por CMF niveles de ión hidroxilo (OH[·]).

Para ello como se indica en la Metodología, se somete a las cepas IC188 e IC203 a un tratamiento generador del ión hidroxilo consistente en la mezcla de con un metal de transición, en nuestro caso, Cu²⁺. Debido a la reacción de Fenton la mezcla de H₂O₂ y NO₃CU produce OH[·]. Para detectar el OH[·] por CMF se utiliza el fluorocromo Dihidrorodamina123 (DHR123). Este fluorocromo en presencia de

H_2O_2 , peroxinitrito o OH^\cdot se oxida y emite fluorescencia detectándose a 515nm (fluorescencia verde).

En la Figura 18 se muestran los niveles intracelulares de H_2O_2 y OH^\cdot en la cepa salvaje tratada con diferentes condiciones prooxidantes, H_2O_2 , NO_3Cu ; $\text{H}_2\text{O}_2+\text{NO}_3\text{Cu}$. Al producirse la reacción de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2+\text{NO}_3\text{Cu}$) se oxida la DHR123, dando lugar a RH123. Como se observa en la Figura 18 la presencia de NO_3Cu también produce un ligero incremento en la fluorescencia de RH123, indicando que el metal añadido al cultivo puede reaccionar con los niveles basales de peróxidos de la cepa salvaje y generar un incremento en los niveles de OH^\cdot .

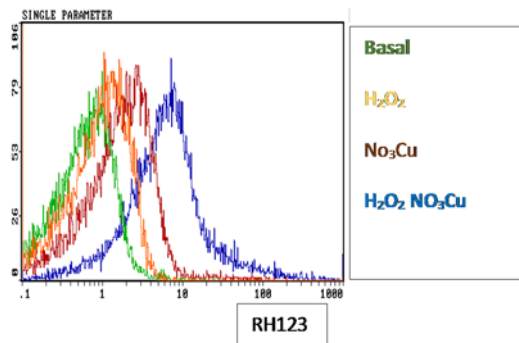
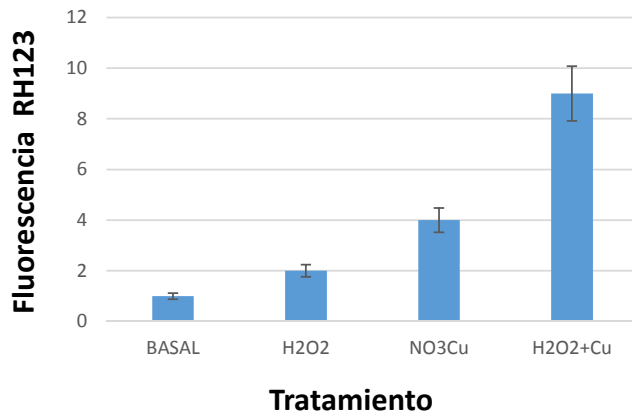


Figura 18 Nivel intracelular de peróxidos y del radical OH. en la cepa IC188. Cultivos de la cepa wild-type (IC188) se trataron con distintas condiciones: H₂O₂, 50 mM de H₂O₂ durante 30 minutos; NO₃Cu 40 µg/mL durante 5 minutos; H₂O₂+NO₃Cu, pre-tratamiento con H₂O₂ 50 mM de H₂O₂ durante 30 minutos y posterior incubación con 40 µg/mL de NO₃Cu durante 5 minutos para generar el radical OH; se detectaron los niveles de ROS con DHR123. Se muestra un ejemplo de un histograma monoparamétrico para RH123 con las diferentes condiciones experimentales ensayadas.

Un problema a resolver es la detección de especies reactivas de vida media muy corta ya que en el protocolo de incubación de varios minutos con la sonda fluorescente, el radical OH^\cdot ya ha interactuado con sus dianas moleculares y esto dificulta su detección. Para solventar este problema en la Figura 19 se muestra un estudio de citometría de flujo en tiempo real o "*in fluxo*" utilizando la cepa salvaje y el mutante *oxyR*-. La ventaja de estos ensayos en tiempo real es que permite cuantificar los niveles de radicales libres que se producen en el instante en el que añadimos el prooxidante a un cultivo bacteriano.

Los cultivos, como se explica en Metodología, se tiñen con el fluorocromo específico, DHR123, durante 15 minutos. En el protocolo citométrico se selecciona los parámetros FL1 (RH123) y tiempo. El protocolo citométrico tendrá un histograma de morfología FSlog vs SSlog y otro histograma en el que se enfrentan en el eje de las ordenadas la fluorescencia de RH123, y en el eje de las abscisas el tiempo. Se inicia la adquisición unos segundos para medir la fluorescencia basal del cultivo, se detiene la adquisición del citómetro se añade rápidamente el prooxidante H_2O_2 o $\text{H}_2\text{O}_2+\text{Cu}^{++}$, reanudando la adquisición hasta que se completen 5 minutos. La zona en la que no aparecen eventos es la zona en la que añadimos los compuestos prooxidantes. Como puede observarse, la cepa mutante IC203 presenta un nivel mayor de fluorescencia tras el tratamiento con H_2O_2 que la cepa salvaje IC188, en las condiciones generadoras de OH^\cdot cuando adicionamos $\text{H}_2\text{O}_2+\text{NO}_3\text{Cu}^{++}$, el incremento en la fluorescencia de la RH123 es mayor en la cepa IC203 que en la cepa salvaje IC188. Se observa en la cepa mutante el mayor nivel de fluorescencia en la

condición del tratamiento conjunto de $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NO}_3\text{Cu}^{++}$. Por lo tanto, con un ensayo sencillo y rápido se puede detectar los niveles de OH que se generan en el cultivo bacteriano en el momento real en el que se produce este radical libre.

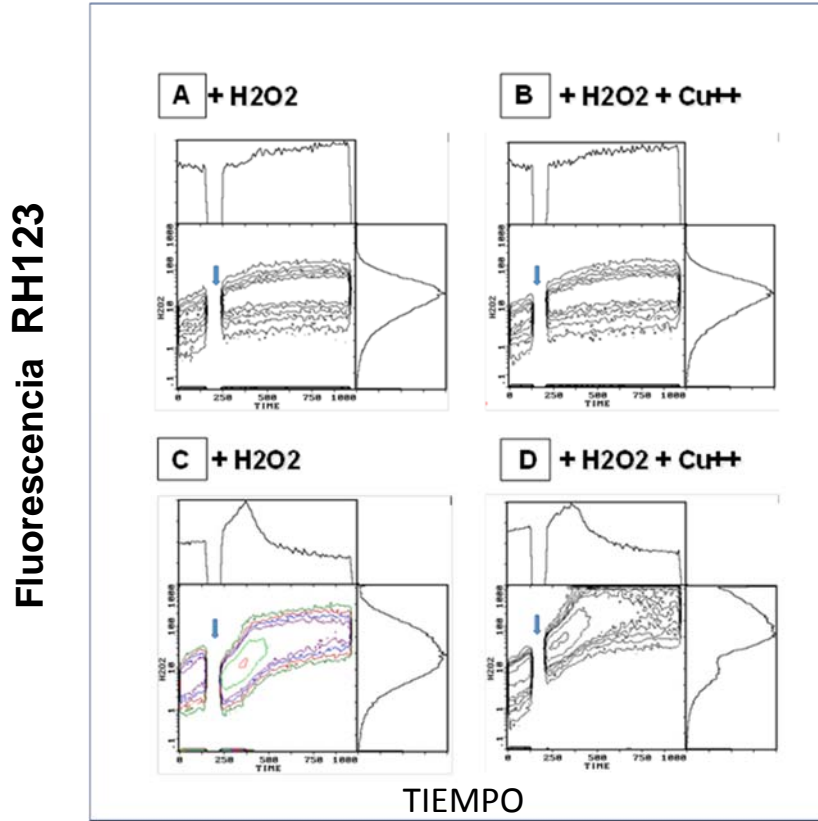


Figura 19 Ensayo en tiempo real de la generación de peróxido y OH. en cepas *oxyR+* IC188 tratadas con pro-oxidantes. *oxyR+*(IC188) (A,B) y *oxyR-* IC203 (C,D). Se procede como se indica en el texto y se describe en la Metodología.

Los ensayos citométricos realizados con la cepa mutante en el gen *oxyR* indican que este mutante tiene niveles elevados de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ cuando se trata con generadores de peróxidos (H_2O_2 , butilhidroperóxido), este aumento en peróxidos viene asociado a una disminución en los niveles de GSH tanto a nivel basal como inducido por prooxidantes, por lo que se propone esta cepa como un buen sistema sensor del nivel de estrés oxidativo generados por xenobióticos.

2.2 Estudio de mutantes en el Regulón soxRS

El regulón soxRS está asociado al control de los niveles de superóxido intracelular en *E.coli*. El regulón SoxRS controla la respuesta frente a los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y regula positivamente genes como superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD), codificada por el gen *sodA*.

Los estudios citométricos llevados a cabo consisten en la determinación de los niveles del anión superóxido en la cepa salvaje (IC188) y en la mutante en los genes *sodA* y *sodB* (IC5232) que codifican para la superóxido dismutasa dependiente de Mn (*sodA*) y la superóxido dismutasa dependiente de Fe (*sodB*). La expresión del gen *sodA* está regulado por el sistema SoxRS, induciéndose su expresión cuando los niveles del anión superóxido se incrementa. La expresión de *sodB* está regulado por el regulón Fur implicado en el control de los niveles intracelulares de Fe.

En estos ensayos se sometieron a la cepa salvaje IC188 y al doble mutante *sodA-sodB*- a diferentes compuestos generadores de superóxido como la plumbagina, el paraquat y la menadiona.

En la Figura 20 se muestra la fluorescencia producida por la oxidación de HE cuando se somete a ambas cepas a la acción de estos compuestos generadores de $O_2^{\cdot-}$. Como se muestra en la Figura 20 A la cepa mutante presenta un nivel mayor de $O_2^{\cdot-}$ que la cepa salvaje cuando se expone a la acción de menadiona. Se puede observar que los niveles basales del $O_2^{\cdot-}$ son ligeramente más altos en la cepa doble mutante IC5232 que en la cepa salvaje IC188. En la Figura 20B se

analizan los niveles intracelulares de GSH tanto a nivel basal como tras inducción con menadiona, se produce una disminución en los niveles intracelulares de GSH en la cepa IC188 y en la cepa IC5232 tras el tratamiento con menadiona, siendo mayor esta disminución en la cepa mutante. Los niveles basales de ambas cepas son diferentes, de nuevo la cepa mutante presenta un nivel menor de glutatión que la salvaje.

En la Figura 21 se muestra el efecto del tratamiento con paraquat de las cepas IC188, IC5232. Se detecta un efecto a dosis altas de este compuesto y como en el caso de la menadiona, la cepa IC5232 tiene aumentado el nivel intracelular de superóxido en relación con la cepa IC188. En conclusión se puede indicar que la cepa mutante *sodA sodB* puede incluirse en estudios en los que se necesita ensayar compuestos que puedan generar O_2^- específicamente ya que es un sistema muy sensible a cambios en los niveles intracelulares de este radical.

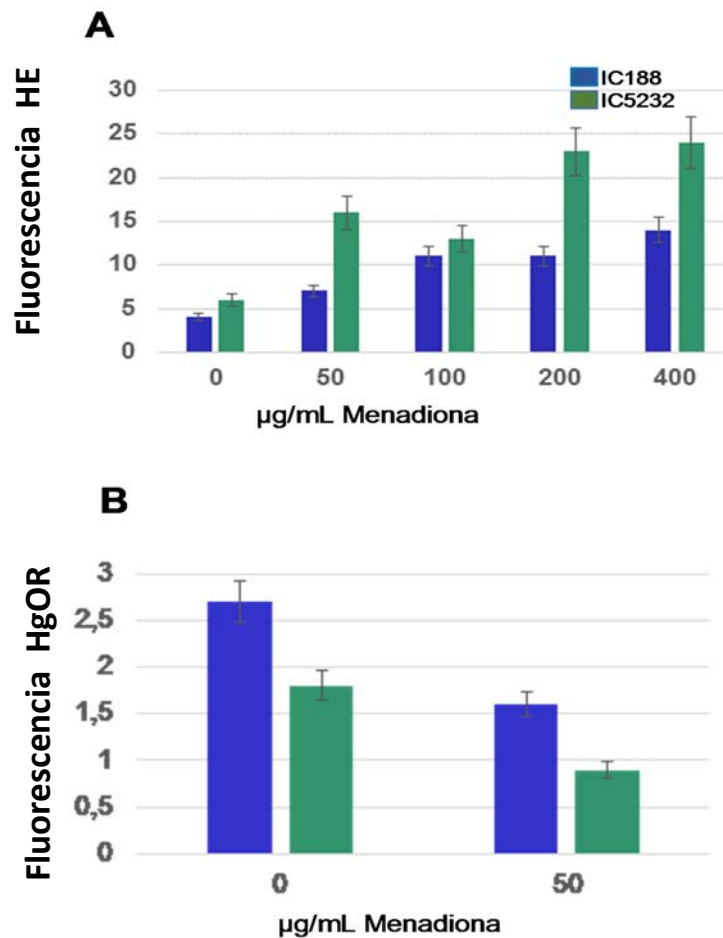


Figura 20. Inducción de superóxido y nivel de glutatión en cepas de E.coli B salvaje (IC188) y doble mutante sodA-sodB- (IC5232) tratadas con menadiona. A) Nivel intracelular de superóxido en cepas wild-type (IC188), sodA- sodB (IC5232) tratadas con menadiona, los niveles de superóxido se detectaron con la sonda flourescente HE **B)** Nivel intracelular de glutatión en cepas oxyR+ (IC188), sodA- sodB – (IC5232) tratadas con menadiona, los niveles de glutatión se detectaron con la sonda flourescente HgOr. Se procede como se indica en la Metodología.

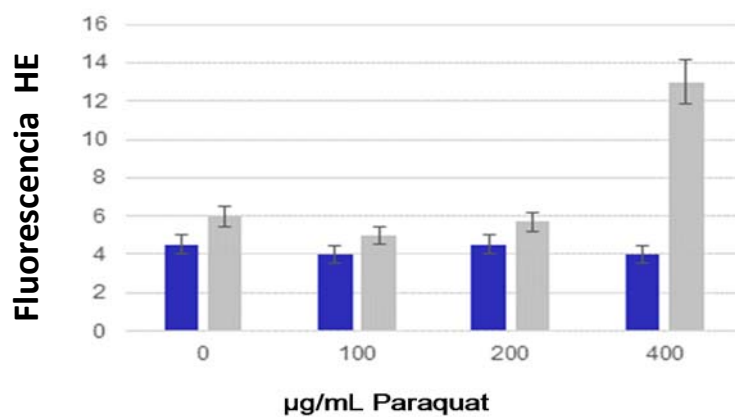


Figura 21. Nivel intracelular de superóxido en cepas wild-type (IC188), sodA- sodB – (IC5232) tratadas con paraquat. La cepa salvaje IC188 (azul) y la doble mutante sodA-sodB- (gris) se trataron con paraquat como se indica en la Metodología, la detección de los niveles de $O_2^{\cdot-}$ se realizó con la sonda fluorescente HE

2.3 Estudio de mutantes deficientes en la regulación de los niveles de glutatión

Muchos microorganismos contienen concentraciones milimolares de tioles de bajo peso molecular (0.1-10 mM) (Masip *et al* 2006). Estos compuestos sirven para mantener un ambiente intracelular reducido, importante para enzimas implicadas en la defensa antioxidante (Malki *et al* 2009) y que combaten los efectos de estrés oxidativo y están implicadas en la detoxificación de compuestos xenobióticos, el GSH es el tiol de bajo peso molecular mejor caracterizado. La aproximación a los niveles intracelulares de glutatión de las diferentes cepas implicadas en este estudio se ha completado con el estudio por citometría de flujo de los niveles de ROS presentes en un mutante deficiente en la L-glutamato cistein ligasa, *gshA*, controlando la reacción que produce la γ -glutamilcisteína a partir de glutamato y cisteína.

La glutamato cistein ligasa interviene en la formación de glutatión, en la bibliografía mutantes en el gen *gshA* no presentaban una sensibilidad mayor a la acción de compuestos oxidantes que la cepa salvaje (Greenberg *et al* 1986).

En la Figura 22 se muestra el ensayo citométrico realizado con la cepa mutante en el gen *gshA* IC5267 y la cepa salvaje IC188. En la Figura 22A se miden los niveles de H_2O_2 con DHDCF-DA en la cepa salvaje y en la mutante para el gen *gshA*, observándose un mayor nivel de peróxidos en la dosis de 50mM y a la dosis de 200mM en la cepa mutante.

En la Figura 22B se presenta la medida de los niveles intracelulares de $O_2^{\cdot -}$ medido por la fluorescencia de HE. Se observa también un incremento en los niveles del $O_2^{\cdot -}$ a la máxima dosis ensayada de H_2O_2 . La muerte inducida por H_2O_2 a la máxima dosis fue del 18%.

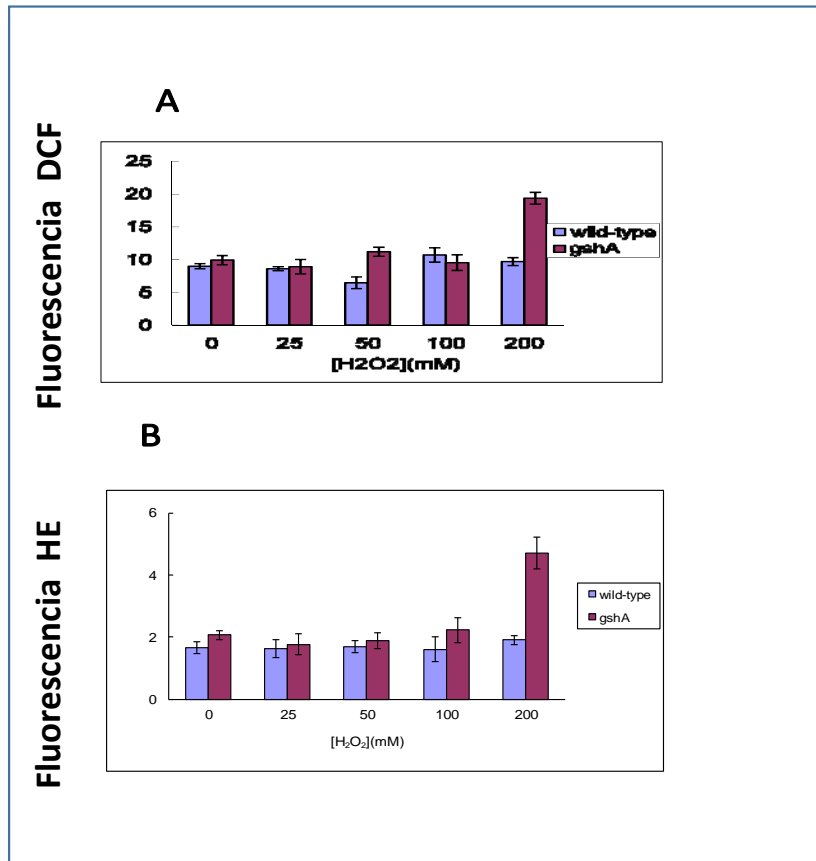


Figura 22 Nivel intracelular de peróxidos y superóxido en cepas salvaje (IC188), y mutante *gshA*- (IC5267) tratadas con H_2O_2 A) Nivel de peróxido detectado con DCFH-DA B) Nivel de superóxido detectado con HE.

Oktyabrsky et al demuestran que la resistencia a agentes oxidantes en cepas deficientes en el gen *gshA* se debe a un aumento en la cepa mutante *gshA* de los niveles de catalasa.

En estos ensayos citométricos se evidencia que se pueden detectar diferencias en los niveles de ROS en mutantes *gshA*- que por los sistemas convencionales de toxicidad hasta ahora ensayados no había sido posible detectar, (Greenberg et al 1986) aportando todos estos ensayos citométricos bacterianos una gran sensibilidad para el estudio de la defensa antioxidante en *E.coli*.

2.4 Aplicación del modelo de biosensores bacterianos para la caracterización de agentes antioxidantes.

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es la hormona segregada por la glándula pineal de los mamíferos, su producción se ajusta a ritmos circadianos teniendo su síntesis máxima durante la noche. Esta hormona está implicada en múltiples procesos habiéndose descrito un efecto como hormona anti-envejecimiento y su uso se ha extendido en el tratamiento del “jet-lag” y del insomnio, existen estudios con ratas en los que se describe una protección frente al daño oxidativo, protegiendo a los animales de los efectos tóxicos del carcinógeno safrole (Tan *et al* 1994). En la revisión hecha por Rodriguez *et al* (2004) se describen diferentes trabajos en los que se demuestra un aumento en la expresión de los genes que regulan la enzima superóxido dismutasa en eucariotas, implicando directamente a esta hormona en la defensa antioxidante.

En la Figura 23 se muestra el efecto antioxidante de la melatonina en cultivos bacterianos de la cepa salvaje IC188. En este estudio, como se describe en la metodología se incubó el cultivo bacteriano en presencia o ausencia de melatonina durante 15 a 60 minutos y los cultivos se sometieron a un tratamiento con H_2O_2 determinándose los niveles de $O_2^{\cdot-}$ con la sonda fluorescente HE. Como se puede observar, los efectos de la inhibición de la producción del $O_2^{\cdot-}$ son ya evidentes a los 15 minutos de pretratamiento con melatonina, pero son más importantes a los 30-60 minutos de cultivos pretratados.

En la literatura (Reiter *et al* 2003) se describen los efectos de la melatonina como scavenger del $O_2^{\cdot-}$ y su acción viene determinada por su capacidad de aumentar la expresión de los enzimas antioxidantes. En nuestro sistema bacteriano la hipótesis sería que podría tener un efecto scavenger ya que se observan efectos en tiempos muy cortos en los que la célula no podría haber activado sus enzimas antioxidantes.

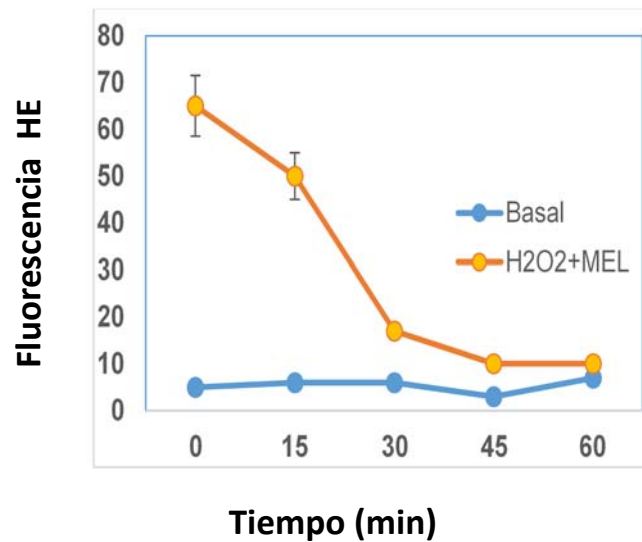


Figura 23. Efecto antioxidante de la melatonina (MEL) en condiciones de estrés oxidativo inducido por el tratamiento con H_2O_2 en la cepa IC188. Medida de los niveles intracelulares de superóxido. Los cultivos bacterianos se pre-trataron con 2 mM de melatonina en los tiempos indicados (15-30-45-60 minutos), antes de ser tratados con 40 mM de H_2O_2 durante 20 minutos. El nivel intracelular de superóxido se midió con HE. Los resultados son la media de tres experimentos.

2.5 Aplicación del modelo de biosensores bacterianos para la detección de especies reactivas de nitrógeno.

En nuestro estudio de los efectos prooxidantes de compuestos generadores de ROS se ha incluido un estudio de la detección de óxido nítrico (NO) en cepas salvajes y deficientes en el gen *oxyR* que han sido tratadas con agentes generadores de NO. En la Figura 24 se muestra los niveles de NO en la cepa salvaje, IC188, tratada con diferentes dadores de NO, de vida media corta, [espermina/NO], y de vida media larga [DEANO]. Para la detección de los niveles de NO se utilizó la

sonda fluorescente DAF-FM, esta sonda se usa para detectar y cuantificar bajas concentraciones de NO, es una sonda no fluorescente hasta que al reaccionar con óxido nítrico forma un derivado benzotriazol fluorescente (Berkels *et al* 2000). Como se muestra en la Figura 24 se detectó los niveles NO tanto en las bacterias tratadas con espermina/NO como con DEANO. A tiempos cortos (5 minutos) y tras incubación a tiempos largos (30 minutos) se encontraron diferencias entre los niveles basales y los inducidos con ambos dadores, produciendo un mayor efecto el dador de vida media larga, DEANO.

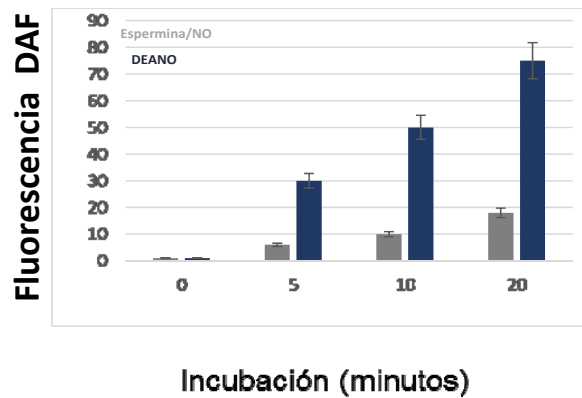


Figura 24. Nivel intracelular de NO de la cepa IC188 tras la exposición a dadores de NO. La cepa IC188 se trató durante los tiempos indicados con espermina/NO (gris) y DEANO (azul). El nivel intracelular de NO se detectó con la sonda fluorescente diaminofluoresceína (DAF). Los resultados son la media de tres experimentos.

En la Figura 25 se muestra un ensayo de la interferencia en la producción de superóxido cuando se trató la cepa salvaje IC188 y la mutante IC203 con plumbagina y espermina /NO. Se observa una disminución en ambas cepas en la producción de superóxido generado por el tratamiento con plumbagina (compuesto “redox-cycling”) cuando se incubaba con el doble tratamiento de plumbagina+espermina/NO. El superóxido que produce la plumbagina se unirá al NO generado por espermina/NO y se generará ONOO⁻, produciéndose una disminución en los niveles de O₂⁻ detectado con la sonda fluorescente HE.

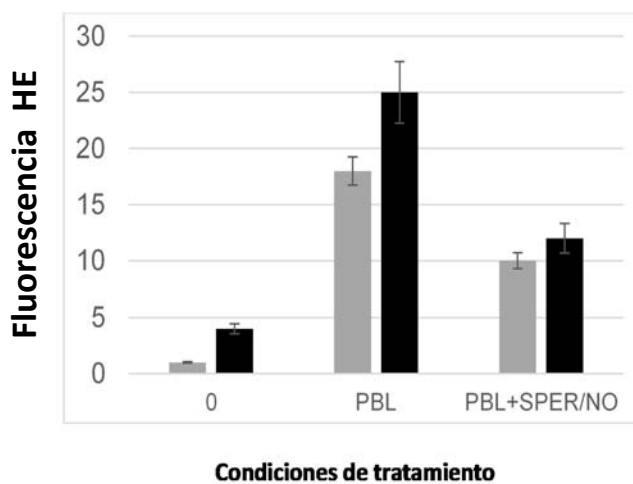


Figura 25 Nivel intracelular de superóxido de IC188 (gris) y la cepa oxyR- IC203 (negro) tras la exposición a generadores de superóxido, plumbagina (PBL) y posteriormente al dador de óxido nítrico Espermina/ NO (PBL+SPER/NO). El nivel intracelular de superóxido se determinó con la sonda fluorescente HE. Los resultados son la media de tres experimentos.

En la Figura 26 se muestra un ensayo de citometría en tiempo real (*In Fluxo*) del fenómeno explicado anteriormente. En este caso se tiñen los cultivos con el fluorocromo DAF-FM para detectar los niveles de NO, se adquiere durante unos segundos y se añade el dador espermina/NO observándose un incremento en los niveles de fluorescencia de la sonda DAF-FM, tras 5 minutos se añade el dador de O_2^- plumbagina y se continúa con la adquisición de la muestra en el citómetro, en este caso se produce una disminución en los niveles de fluorescencia en la sonda que detecta NO mostrando que la producción de ONOO $^-$ disminuiría los niveles de óxido nítrico detectado con DAF-FM.

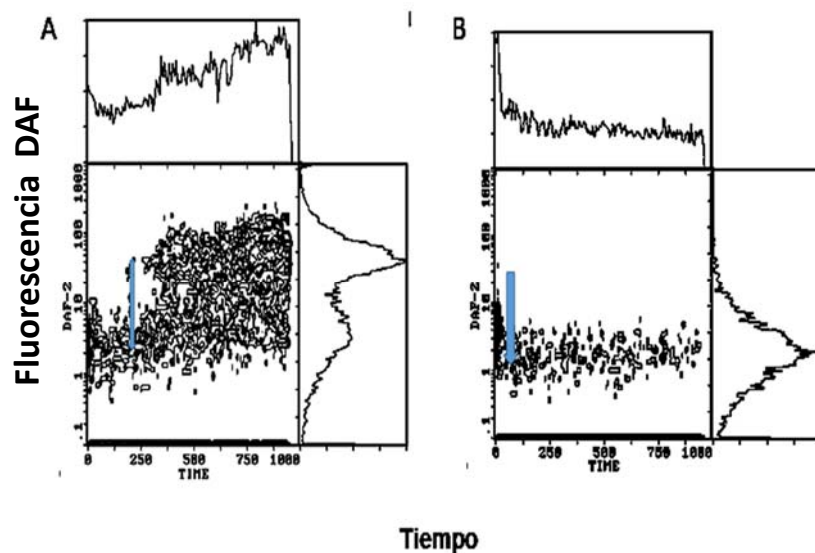


Figura 26 Ensayo en tiempo real de la producción de NO en la cepa IC188 inducido con Espermina/NO y plumbagina A. Inducción de la producción de NO medido con DAF tras adicionar espermina/NO (flecha azul) B. Inducción de NO con espermina y plumbagina.

Por último, en la Figura 27 se muestra la detección de ONOO^\cdot con el dador SIN-1, este compuesto es capaz de generar NO y en presencia de O_2 genera O_2^\cdot y NO considerándose un generador de peroxinitrito (Schrammel et al 1998). La sonda DHR123 se oxida a Rodamina123 al detectar niveles intracelulares de peróxidos y peroxinitrito (Wardman 2008). En este ensayo la cepa salvaje mostraba un nivel mayor de producción de ONOO^\cdot cuando se trataba con el dador SIN-1 que la cepa mutante *oxyR*⁻, indicando que la producción de ONOO^\cdot es mayor en la cepa salvaje. La cepa *oxyR*⁻ presenta un nivel basal de O_2^\cdot mayor que la cepa salvaje por lo que la interacción entre los radicales libres generados por SIN-1 puede estar afectada ya que los niveles basales de superóxido son mayores.

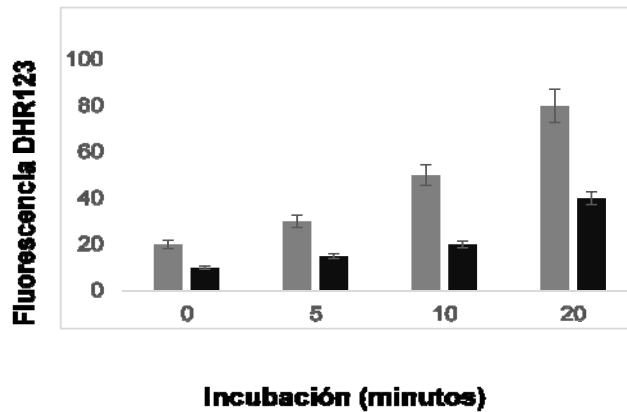


Figura 27. Inducción de ONOO^\cdot en cepas salvaje IC188 y mutante *oxyR*⁻ IC203 tras inducción con SIN-1 (dador de O_2^\cdot y NO $^\cdot$). Las cepas salvaje IC188 (gris) y mutante en *oxyR* IC203 (negro) se incubaron durante 20 minutos en presencia de SIN-1, compuesto generador de O_2^\cdot y NO. Se utilizó la sonda fluorescente DHR123 para detectar los niveles de ONOO^\cdot .

En este estudio se ha podido observar la producción de radicales libres en las diferentes cepas bacterianas deficientes en distintas vías de la defensa antioxidante. Existe una correspondencia entre las especies libres detectadas y los mutantes estudiados así, en mutantes *oxyR* deficientes en la vía de la detoxificación del H_2O_2 se ha podido detectar la presencia de H_2O_2 utilizando para ello la sonda DHDCF-DA, en la cepa deficiente en superóxido dismutasa *sodA-sodB*- se ha podido comprobar la producción de la especie reactiva $O_2^{\cdot-}$ con la sonda HE, y por último se puede detectar y medir la producción del OH^{\cdot} utilizando un ensayo citométrico en tiempo real con la sonda DHR123, estos resultados muestran por primera vez la utilización de la citometría de flujo en el estudio de mutantes en diferentes vías de la respuesta antioxidante de *E.coli* y abre una vía a posteriores estudios con diferentes regulones implicados en la respuesta antioxidante.

En estos ensayos también se han detectado niveles de GSH por citometría de flujo, observándose una disminución de los niveles cuando se someten a diferentes compuestos prooxidantes.

Por último se puede estudiar por citometría de flujo la generación de RNS como el NO y el $ONOO^{\cdot}$. Esto nos permitirá en estudios futuros detectar niveles de NO en diferentes mutantes deficientes en la defensa frente a RNS y poder acceder al estudio mecanístico del efecto de las diferentes especies reactivas sobre la fisiología bacteriana.

3. APLICACIÓN DEL MODELO DE BIOSENSORES BACTERIANOS PARA ESTUDIOS DE TOXICIDAD OXIDATIVA LIGADA A LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS

Tras haber validado el desarrollo del modelo bacteriano de biosensores de estrés oxidativo, nos planteamos su aplicación a los estudios en los que nuestro laboratorio estaba implicado, bien como línea propia de investigación (toxicidad de fármacos o compuestos químicos) o en colaboración con el Laboratorio de Toxicología Genética del Centro de Investigación Príncipe Felipe (identificación de compuestos que ejercen toxicidad oxidativa, a través del sistema ROS-TOX, que se describe a continuación).

De esta forma, el modelo bacteriano se ha aplicado con dos tipos de objetivos:

a) Complementar los estudios bacterianos clásicos del sistema ROS-TOX con la medida citométrica de viabilidad y generación intracelular de ROS. El sistema ROS-TOX utiliza el modelo bacteriano de *E. coli* B para una caracterización mecanística de la toxicidad. En estos ensayos, la toxicidad mediada por ROS, denominada toxicidad ROS-TOX, se detecta a través de la inducción de muerte en la cepa *oxyR-*, ya que esta cepa es deficiente en las defensas antioxidantes (Martinez *et al* 2000; Urios *et al* 2006). Por el contrario, ROS-TOX está inhibida en la cepa *oxyR+*, ya que ésta contiene todos los mecanismos de defensa frente a ROS (catalasa, y alquilhidroperoxidasa) ambos regulados por OxyR.

b) Complementar los estudios de toxicidad química con líneas celulares humanas, para evaluar la coherencia del modelo bacteriano

al modelo eucariótico de estrés oxidativo y para incluir una etapa preliminar de cribado sencillo que permita identificar rápidamente compuestos con potencial oxidante (o antioxidante) que puedan ser incluidos en la batería de los ensayos citómicos especializados.

3.1 Estudio de la generación de ROS en derivados de la estructura del catecol

Los compuestos fenólicos son sustancias naturales conocidas por exhibir propiedades antioxidantes (Rice-Evans *et al* 1996), sin embargo estos compuestos pueden tener propiedades adversas para el ser humano incluyendo carcinogénesis y citotoxicidad (Stich *et al* 1991). Los efectos adversos de los fenoles pueden estar basadas en la capacidad de los compuestos fenólicos en autooxidarse a quinonas, con la producción de ROS, como peróxido y superóxido. Algunos compuestos como catecol, hidroquinona y catecolaminas se han caracterizado como mutágenos oxidativos en el ensayo de mutagénesis utilizando la cepa *oxyR*- IC203 (Martinez *et al* 2000).

La toxicidad de los compuestos fenólicos se produce por un mecanismo oxidativo que genera superóxido en reacciones de autooxidación y puede dar lugar por dismutación a peróxido de hidrógeno. Se había mostrado (Urios *et al* 2003) que compuestos fenólicos simples como catecol, ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC), hidroquinona y ácido homogentísico inducen daño mutagénico y efectos citotóxicos a través de un mecanismo oxidativo detectable en cepas *oxyR*- (ROS-TOX positiva, Figura 28). En cepas *oxyR*+ este daño oxidativo se previene o minimiza, ya que la bacteria induce enzimas como catalasa y alquilhidroperoxidasa (Seaver *et al*

2001) codificadas por genes regulados por OxyR (Zheng et al 2001). Sin embargo, la oxidación, catalizada por óxido nítrico, de los compuestos fenólicos que contienen sustituyentes metilo (metilcatecol y metilhidroquinona) capaces de donar electrones produce toxicidad no oxidativa (Figura 28) con un marcado efecto citotóxico en la cepa OxyR+, revelando un mecanismo de toxicidad no mediado por peróxido de hidrógeno (ROS-TOX negativa).

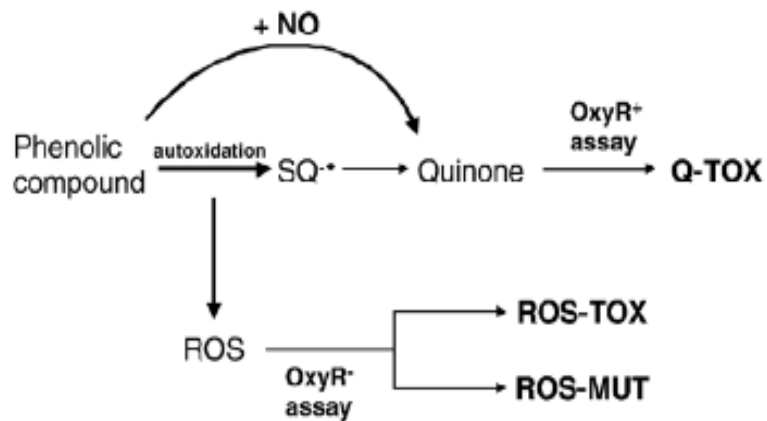


Figura 28. La reacción de oxidación de los compuestos fenólicos a quinonas determina su toxicidad.

En la primera aplicación del modelo bacteriano de biosensores de estrés oxidativo, se caracterizaron los mecanismos de toxicidad de una serie de derivados fenólicos con distintos sustituyentes metilo y se evaluó la citotoxicidad ROS-TOX de estos compuestos en las cepas *oxyR+* y *oxyR-*. Los compuestos estudiados fueron catecol (**CAT**); 3,4,dihidroxifenilacético (**DOPAC**); ácido homogentésico (**HGA**),

hidroquinona (**HQ**); 4-metilcatecol (**MCAT**); metilhidroquinona (**MHQ**) y ácido caféico (**CAF**)

Como se describe en Metodología, las medidas de citotoxicidad se realizaron mediante el ensayo ROS-TOX en placa, mientras que la medida de la generación intracelular de superóxido en las mismas condiciones experimentales se llevó a cabo en paralelo mediante citometría de flujo, utilizando el marcador fluorescente HE.

En la Figura 29 se muestra el resultado del ensayo en placa de citotoxicidad ROS-TOX con las cepas salvaje y mutante en el gen *oxyR*. La cepa *oxyR+* es resistente a compuestos como CAT, CAF, DOPAC, HQ, HGA y es sensible a MHQ y MCAT. Por el contrario, el ensayo ROS-TOX de estos compuestos sobre la cepa mutante *oxyR-* genera una identificación de toxicidad distinta, ordenándose de mayor a menor toxicidad: MHQ, HQ, HGA, MCAT, DOPA. El ensayo ROS-TOX no detectó toxicidad para CAT y CAF.

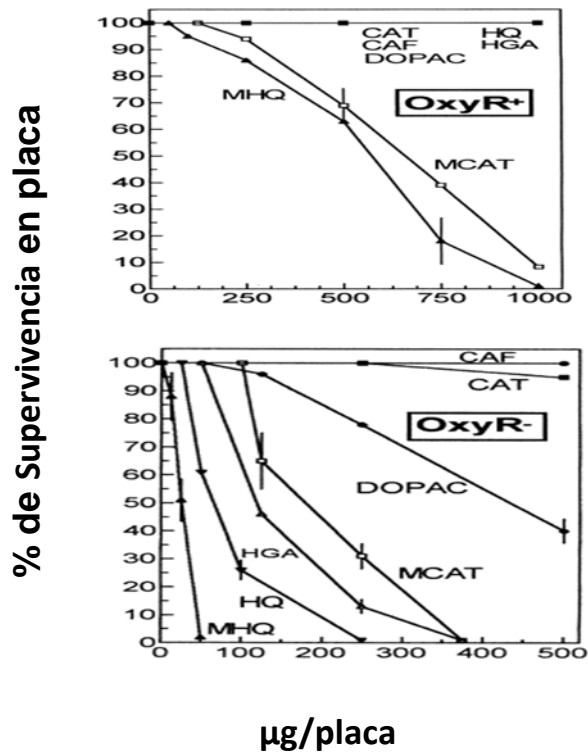


Figura 29. Curvas de supervivencia de las cepas *oxyR+* y *oxyR-* tras 24 horas de exposición a compuestos fenólicos. Las cepas salvaje y mutante se trataron con las dosis indicadas en la figura de los siguientes compuestos: CAF ácido caféico; CAT catecol; DOPAC 3,4,dihidroxifenilacético; HGA ácido homogentésico, HQ hidroquinona, MCAT 4-metilcatecol, MHQ metilhidroquinona. Este ensayo se determinó en placa (ver Metodología).

En la Tabla 7 se presentan los datos del ensayo por citometría de flujo para detectar la generación de superóxido de los compuestos CAT, MCAT, HQ, MHQ con la sonda fluorescente HE. En este ensayo se observó un diferente nivel de superóxido en la cepa salvaje y la mutante *oxyR*. En la cepa salvaje, tras 3 horas de incubación sólo MHQ

generaba un nivel de superóxido superior al nivel basal. Sin embargo, en un ensayo de 7 horas de incubación, los compuestos MCAT, HQ, y MHQ indujeron un incremento en la oxidación de la HE, indicador de un aumento en los niveles de superóxido. En la cepa mutante *oxyR* a las 3 horas de exposición los compuestos MHQ, MCAT y HQ aparecen como generadores de superóxido mientras que el CAT no presenta diferencias con las condiciones basales. En el ensayo de 7 horas, por el contrario, todos los compuestos analizados indujeron un aumento en la producción de superóxido, siendo el CAT el compuesto en el que el aumento de superóxido era mayor.

Tabla 7 Nivel intracelular de superóxido inducido por compuestos fenólicos en las cepas <i>oxyR+</i> y <i>oxyR-</i>.				
	<i>oxyR+</i>		<i>oxyR-</i>	
	3H	7H	3H	7H
BASAL	0.3	0.8	0.8	2.0
CAT	0.3	0.9	1.1	4.4
MCAT	0.9	17.9	14.6	72.8
HQ	0.3	5.0	9.9	31.8
MHQ	11.4	9.2	35.0	29.3

Los cultivos bacterianos se trataron durante 3 horas (3H) y 7 horas (7H) con los compuestos, el nivel de superóxido se detectó con HE. Los resultados son la media de tres experimentos, la desviación estándar máxima fue del 16%.

Los resultados del ensayo citométrico que complementa a ROS-TOX confirman la producción de superóxido de los compuestos fenólicos ensayados, previamente sugerida por Urios *et al* (2003) y demuestran que compuestos fenólicos simples como catecol, ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC), hidroquinona y ácido homogentísico

inducen daño mutagénico y efectos citotóxicos a través de un mecanismo oxidativo. Este mecanismo podría implicar a quinonas derivadas de la oxidación de metilcatecol y metilhidroquinona (Moore 1977). Esta posibilidad es consistente con los altos niveles de oxidación de MCAT y MHQ cuando se mide la generación de la producción intracelular de superóxido. Se ha de resaltar que la producción de superóxido fue mayor en la cepa *oxyR-* que en *oxyR+*, indicando que el estado celular prooxidante de la cepa *OxyR-* favorecería las reacciones de autooxidación.

De esta forma, nuestros resultados validan el esquema de la la Figura 28 que diferencia entre la toxicidad procedente del daño oxidativo (ROS-TOX) y la toxicidad procedente de quinonas, en un mecanismo en independiente de ROS (Q-TOX).

4. EXTRAPOLACIÓN DEL MODELO DE BIOCENSORES BACTERIANOS PARA ESTUDIOS DE TOXICIDAD OXIDATIVA EN HUMANOS

4.1 Estudio comparativo de la toxicidad oxidativa de derivados de MDMA en la cepa mutante *oxyR*- y en la línea neuronal humana SH-SY5Y

En nuestro laboratorio se llevan a cabo con mucha frecuencia estudios experimentales de estrés oxidativo utilizando como modelos distintas líneas celulares de origen animal y humano. Entre estas destaca la línea SH-SY5Y. Esta línea de neuroblastoma humano, ampliamente usada en estudios de neurobiología *in vitro*, presenta un interés especial para nuestros estudios de toxicidad de catecoles y otros compuestos fenólicos, ya que expresa las actividades tirosina hidroxilasa y dopamina- β -hidroxilasa, características de las neuronas catecolaminérgicas (Kovalevich et al 2013). Por dicha razón, hemos añadido el ensayo de viabilidad y de detección de ROS en neuronas humanas a nuestra batería de ensayos con las cepas bacterianas mutantes en la defensa antioxidante. De esta forma, podemos evaluar la validez de nuestro modelo en *E. coli* cuando se compara con un modelo de células humanas.

El presente estudio se realizó en colaboración con el Laboratorio de la Dra. Martine Langeron (Faculté de Pharmacie, CNRS-Université Paris Descartes, Paris) tras el aislamiento en dicho laboratorio del enantiómero (-) de la 3,4-hidroximetanfetamina (HHMA), un intermediario metabólico de la 4-metilen-dioxi-metanfetamina (MDMA), droga de abuso conocida como éxtasis.

MDMA es una sustancia psicoactiva selectiva hacia las neuronas cerebrales serotoninérgicas, en las que inhibe la recaptación de la serotonina al unirse a los transportadores de serotonina. MDMA también influencia los niveles de dopamina y noradrenalina del espacio presináptico en las neuronas cerebrales. Sin embargo, los mecanismos precisos por los que esta droga ejerce su acción neurotóxica están por elucidar, aunque se ha implicado, entre otros factores, la formación de ROS y RNS en la neurotoxicidad de MDMA (Capela *et al* 2009). Todos estos factores pueden actuar de manera sinérgica, por lo que el estudio del metabolismo de esta droga es crucial para caracterizar su modo de acción (Goni-Allo *et al* 2008; Esteban *et al* 2001; Monkset *et al* 2004, Milhazes *et al* 2006).

En humanos, MDMA se metaboliza a HHMA (Segura *et al* 2001) y, debido a que la mitad catecol de este compuesto se puede oxidar a quinona, HHMA tiene una doble reactividad. Por una parte, puede dar lugar al radical semiquinona y generar ROS por ciclos redox. Además, el compuesto es altamente electrofílico y se puede conjugarse con tioles como GSH y N-acetilcisteína (NAC) y formar conjugados catecol-tioeter que inducen citotoxicidad mediada por ROS. (Felim *et al* 2007). El conjugado 5-(N-acetilcistein)-N-metil-R-metildopamina (5-NAC-HHMA) sería uno de los implicados en la neurotoxicidad (Jones *et al* 2005; Erives *et al* 2008).

Para estudios de neurotoxicidad de MDMA y sus derivados es imprescindible considerar la estereoquímica de MDMA y de sus metabolitos, como HHMA, ya que se ha descrito que la acción tóxica de los metabolitos de MDMA depende de su quiralidad (Meyer et al 2008). MDMA se consume como un racemato, que es una mezcla equimolar de las formas R-(-)MDMA y S-(-)MDMA, pero ambos enantiómeros muestran unos perfiles farmacológicos y farmacocinéticos diferentes (Anderson *et al* 1978). La mayoría de los agentes psicomiméticos tienen un centro quiral, siendo el isómero más potente el que presente la configuración R (Anderson et al 1978), aunque en el caso de MDMA el enantiómero S muestra propiedades psicomiméticas (Largeron 2012). Por otra parte, en estudios de metabolización *in vitro* del MDMA se demostró que la forma que se metabolizaba por los citocromos CYP2C19 y CYP2D6 era el enantiómero S-(-)HHMA (23). En experimentos posteriores, se observó, además, una transformación del enantiómero S-(-) HHMA en el R(-) HHMA (Meyer *et al* 2009).

La disponibilidad del enantiómero puro, sintetizado por el grupo de Largeron ha permitido, por primera vez su análisis toxicológico, ya que en los estudios previos el metabolito intermedio HHMA se utilizaba en su forma racémica (\pm) HHMA. De esta forma, para desarrollar el presente estudio se seleccionó el enantiómero puro R-HHMA y se comparó con un compuesto mezcla de los dos enantiómeros así como con otras moléculas relacionadas, como 9-aminoalcohol (subproducto de la purificación), 3-metoxi-4-metilanfetamina (MMA), 3-metoximetanfetamina (MMMA) y

dopamina. En la Figura 30 se muestra la estructura química de los compuestos analizados que están relacionados en su estructura y que se diferencian en los sustituyentes que cada molécula posee. En la Figura 31 se muestra la diferente activación metabólica que posee el compuesto inicial, que se metaboliza de manera diferencial si se trata del enantiomero (+)MDMA o (-)MDMA, dando lugar a (-)HHMA o (+)HHMA.

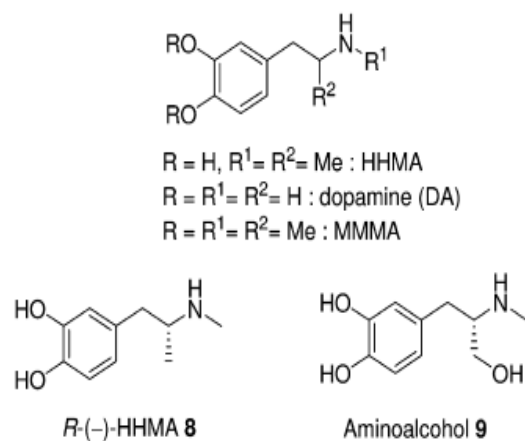


Figura 30. Estructura química de los compuestos relacionados con la molécula de MDMA.

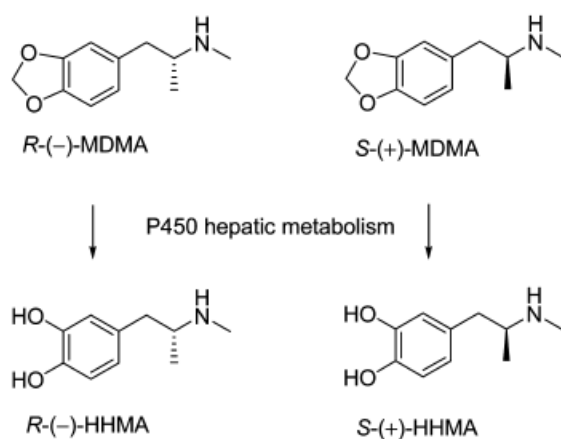


Figura 31. Estequiometría del metabolismo hepático en la formación de R -(-) HHMA y S -(-) HMMA

La Figura 32 muestra el esquema de la obtención del compuesto HHMA.

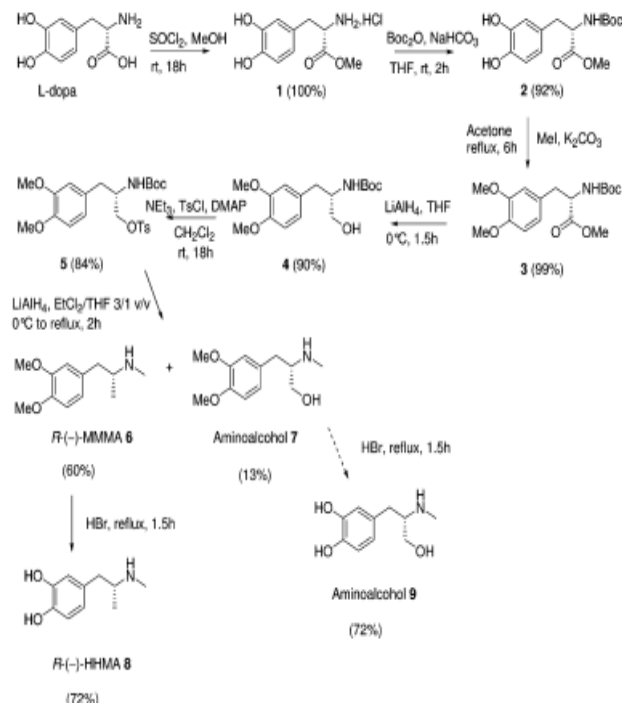


Figura 32. Síntesis de R(-) HHMA

Como en los estudios descritos en apartados anteriores, se ha usado el modelo bacteriano para una caracterización mecanística de la toxicidad. En estos ensayos, la toxicidad mediada por ROS (llamada toxicidad ROS-TOX) se detecta en la cepa *oxyR-*, ya que esta cepa es deficiente en las defensas antioxidantes (Martinez et al 2000, Urios et al 2006), por el contrario ROS-TOX no se manifiesta en la cepa *oxyR+*.

Para todos los metabolitos indicados se llevaron a cabo cuatro estudios complementarios de toxicidad, consistentes en:

- a) Ensayo citométrico de citotoxicidad con PI en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y
- b) Ensayos de toxicidad ROS-TOX con las cepas de *E.coli* B.
- c) Ensayo citométrico de generación de superóxido mitocondrial en la línea celular SH-SY5Y.
- d) Ensayo citométrico de apoptosis en la línea celular SH-SY5Y.

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad se muestran en la Tabla 8. Como se puede apreciar, los derivados enantiómeros de HHMA presentaban un mismo valor de citotoxicidad medida por citometría de flujo con la sonda fluorescente PI, que detecta las células muertas, ya que sólo penetra en células con la membrana plasmática comprometida. El enantiómero R(-) HHMA y el racémico (\pm) HHMA inducen una disminución similar en la viabilidad celular, con un valor de $TC_{50}=0.3$ mM, del mismo orden que la toxicidad producida por la dopamina, con $TC_{50}=0.25$ mM. El intermediario 9-aminoalcohol, sintetizado en la biosíntesis de R(-) HHMA, presenta un valor de TC_{50} de 1 mM. Por último, el metabolito MMMA cuya estructura es similar a HHMA, pero cuyo grupo catecol está protegido por sustituyentes metoxilo, presenta un valor de citotoxicidad más bajo, con $TC_{50} = 11.3$ mM.

Tabla 8 Citotoxicidad in vitro de R(-)HHMA y derivados de MDMA				
TC50 en el ensayo				
Compuesto	SH-SY5Y(a)	E.coli(b)		
	PI	OxyR-	OxyR-/TIR	OxyR+
R(-)HHMA	0.3	0.8	0.6	-(d)
R(+_)HHMA	0.3	0.75	0.5	-
Aminoalcohol	1	5	2	-
(+_)MMMA	11.3	-	-	-
DOPAMINA	0.25	4	1.8	-

SH-SY5Y es una línea dopaminérgica de neuroblastoma humano. PI Determinación de la citotoxicidad por en el ensayo de la tinción con PI. TC50 se calcula en mM TC50 en el caso de la línea celular (a) y en $\mu\text{mol/placa}$ en el caso de las cepas de *E.coli* ensayadas (b). Tir indica la adición al ensayo de 50 unidades de tirosinasa. (d) la supervivencia fue mayor del 50%

Los resultados del ensayo de citotoxicidad con *E.coli* muestran que el enantiómero R(-)HHMA y el racémico (\pm) HHMA tienen un valor de TC_{50} similar, 0.8 y 0.75 $\mu\text{mol/placa}$ respectivamente en la cepa *oxyR-*, disminuyendo este valor cuando se añade a la placa tirosinasa que cataliza la reacción a la formación de O-quinonas, con valores de TC_{50} de 0.6 y 0.5 $\mu\text{mol/placa}$ respectivamente. Para (\pm) MMMA la toxicidad ROS-TOX no se produce, alcanzando valores TC_{50} de 5 y 4 $\mu\text{mol/placa}$ para 9-aminoalcohol y dopamina, respectivamente. Esta toxicidad se incrementa cuando se añade tirosinasa, alcanzándose valores TC_{50} de 2 y 1.8 $\mu\text{mol/placa}$ respectivamente. El incremento en la toxicidad promovida por la tirosinasa sugiere que en la oxidación de las catecolaminas a quinonas mediante ciclos redox incrementará la producción de ROS. Por el contrario, la respuesta negativa en los ensayos de *oxyR+* aún en presencia de tirosinasa (datos no mostrados) es indicativo de la ausencia de toxicidad promovida por quinonas (Q-

TOX), la cual es resistente a las defensas antioxidantes. (Urios *et al* 2006, Meyer *et al* 2009).

En la Tabla 9 se muestra los efectos en la generación de superóxido mitocondrial utilizando la línea SH-SY5Y, los compuestos ensayados fueron R(-) HHMA, (±)HHMA, 9-aminoalcohol y dopamina. No se observaron diferencias en la generación mitocondrial de superóxido por estos compuestos, sólo un leve incremento los compuestos R(+) HHMA, HHMA racémico, y 9-aminoalcohol con respecto a los niveles de dopamina y a la máxima dosis ensayada.

Tabla 9. Generación mitocondrial del anión superóxido en SH-SY5Y por R(-)HHMA en comparación con catecolaminas relacionadas.		
Compuesto	Dosis (mM)	Fluorescencia MitoSOX
R(-)HHMA	0	8.0
	0.1	8.0
	0.5	14.8
R(+_)HHMA	0.1	8.6
	0.5	13.3
Aminoalcohol	0.25	11.5
	0.5	13.3
DA	0.1	9.1
	0.31	10.1

En la Tabla 10 se muestra los valores de apoptosis determinada a través de la detección citométrica de caspasa 3 activada, utilizando un anticuerpo fluorescente anti-caspasa 3 procesada. Los resultados muestran a dosis bajas un aumento en la actividad caspasa en los derivados R(-) HHMA y (±) HHMA casi 5 veces mayor que el nivel basal, mientras que 9-aminoalcohol y dopamina incrementan la apoptosis 1.5 veces con respecto a los niveles basales. El compuesto MMMA aumenta 2 veces la apoptosis con respecto a los niveles basales, según el ensayo de caspasa 3. En los ensayos de citotoxicidad con PI, este compuesto mostraba una población con permeabilidad parcial al PI cercana al 50% de las células totales (datos no mostrados). Esta región intermedia para PI se relaciona habitualmente con las células en apoptosis, pero en ensayo del procesado de la caspasa 3 no se observaron diferencias, por lo que este dato requerirá un estudio adicional.

Tabla 10. Estudio por citometría de flujo de la muerte celular y actividad caspasa-3 en SH-SY5Y tratada con catecolaminas.			
Compuesto	Dosis (mM)	PI+(%)	Actividad caspasa-3 (%)
R(-)HHMA	0	23	9
	0.1	34	36
	1	80	37
R(+_)HHMA	0.1	30	42
	1	82	37
Aminoalcohol	0.5	29	15
	1	51	27
(+_)MMMA	10	25	18
DA	0.1	35	16
	1	83	22
Camptotecina	0.0005	ND	50

Los estudios toxicológicos llevados a cabo con la línea SH-SY5Y revelan una toxicidad similar entre el HHMA racémico y su derivado R-enantiomero. Al incluir en este trabajo los datos de la toxicidad en placa con derivados *oxyR*- de *E.coli* podemos determinar que la toxicidad es oxidativa, con una buena correlación entre los resultados en la línea humana y en la bacteria deficiente en *oxyR*, lo que nos permite concluir que la línea presenta baja protección frente a toxicidad oxidativa y que su muerte estaría mediada por ROS.

El toxicóforo (parte química reactiva) de MDMA sería el grupo catecol, lo que le relaciona con otras catecolaminas como la dopamina. La cadena lateral alquilamina de los derivados de las catecolaminas también tiene una función. Como se observa en los resultados R(-)HHMA y 9-aminoalcohol son dos enantiómeros puros y presentan diferencias en su toxicidad en el ensayo de *E.coli*. Probablemente la diferencia en su lipofiliidad sea la respuesta, ya que R(-) HHMA es más tóxico y más lipofílico que el 9-aminoalcohol (Felim *et al* 2010). Dado que la toxicidad del racémico (\pm) HHMA y el enantiómero R(-)HHMA tienen un perfil toxicológico similar, sería necesaria la síntesis de su S-enantiomero para comparar (Martínez *et al* 2012).

El toxicóforo catecol no está presente ni en MDMA, ni en MMMA en la que los dos grupos fenólicos están protegidos por sustituyentes metoxilo. Por lo tanto, se puede concluir que existiría una toxicidad general para el MDMA en la que el grupo catecol está protegido y una toxicidad que se produce a consecuencia de su metabolización, que da lugar a los derivados catecol existentes en HHMA y que sería una toxicidad oxidativa.

4.2 Aplicación del modelo de biosensores bacterianos de estrés oxidativo a la detección de toxicidad oxidativa de compuestos candidatos en el desarrollo de un fármaco antiinflamatorio

La citometría de flujo ha encontrado un gran campo de aplicación en las fases tempranas del descubrimiento de fármacos, donde los ensayos basados en células permiten descubrir y optimizar dianas terapéuticas y realizar estudios de cribado para identificar o descartar compuestos candidatos. En general, la mayor parte de los ensayos celulares por citometría se dirigen al estudio de parámetros indicadores de proliferación celular, muerte celular o de activación de receptores y transducción de señal. No se ha descrito ensayos celulares sistemáticos de estrés oxidativo en el entorno del descubrimiento de fármacos y, sin embargo, la toxicidad oxidativa es un fenómeno importante en la acción o la biotransformación de muchos fármacos y está implicada en sus acciones terapéuticas o en sus efectos indeseables.

Como se ha comentado más atrás, utilizando el modelo bacteriano de biosensores de estrés oxidativo se pueden diseñar ensayos que permiten identificar rápidamente a un compuesto como generador de ROS e, incluso, determinar si el compuesto es citotóxico por generación de ROS o por su propia estructura química. De esta forma se pueden llevar a cabo estudios de relación estructura-función, con un alto grado de sensibilidad, como se ha mostrado en el apartado anterior. Además, se pueden diseñar ensayos multiparamétricos integrados, para estudios mecanísticos de xenobióticos o fármacos que pueden incluir ensayos de aspectos fisiológicos bacterianos, como

el potencial de membrana plasmático, los movimientos de Ca^{+2} , el ciclo celular, etc.

Recientemente, la compañía farmacéutica española Noscira se interesó en el desarrollo farmacológico de moléculas derivadas de tideglusib, un inhibidor de la enzima glucógeno sintasa kinasa (GSK3).

GSK3 se ha descrito como un nexo de unión entre dos vías patogénicas en la enfermedad de Alzheimer: el péptido beta-amiloide y la proteína Tau. Esta proteína es uno de los componentes de los ovillos neurofibrilares que se observan en pacientes de Alzheimer. GSK3 es una enzima clave en la hiperfosforilación de Tau, que conllevaría la formación de ovillos neurofibrilares (Lucas et al 2001). Por otra parte, se postula que los depósitos del péptido beta-amiloide serían los responsables de la enfermedad. Se ha demostrado que inhibidores de GSK3, del tipo tiazolidona, logran un aumento de la vida neuronal en modelo de enfermedad de Alzheimer en ratones (Serenó et al 2009).

Recientemente se había propuesto que tideglusib y compuestos derivados podrían inducir la generación de ROS. (Dominguez et al 2012). Por dicha razón, en una reciente colaboración con la compañía farmacéutica Noscira se abordó el estudio de la posible toxicidad oxidativa del compuesto parental Tideglusib (NP03112) y otros cuatro compuestos candidatos derivados de la molécula parental fueron suministrados de forma codificada por Noscira (NP031111, NP111404, NPE110901, NPE100928).

El estudio se llevó a cabo con un perfeccionamiento de nuestro modelo experimental de biosensores bacterianos, que incluía tres

cepas de E.coli B, la cepa salvaje oxyR+ (IC188) y los mutantes oxyR- (IC203) y sodA- sodB- (IC5232). Como control positivo para validar la cuantificación de citotoxicidad se utilizó 2-propanol, un agente antibacteriano. Como control positivo para validar la determinación de ROS, se utilizó el prooxidante cumeno hidroperóxido.

Los ensayos realizados se describen en Metodología y consistieron en diferentes tipos de aproximación experimental:

- a) Ensayo clásico de citotoxicidad en placa tras 24 h de incubación.
- b) Ensayo citómico de citotoxicidad tras 30 min de incubación, utilizando el kit Live/Dead BacLight.
- c) Ensayo citómico de generación de anión superóxido tras 30 min de incubación, utilizando el fluorocromo HE.
- d) Ensayo citómico de generación de peróxidos tras 30 min de incubación, utilizando el fluorocromo DCFH DA.

De esta forma, los parámetros totales que se determinaron en los ensayos fueron:

- a) Citotoxicidad general.
- b) Inhibición del crecimiento bacteriano en placa.
- c) Determinación de los niveles intracelulares de anión superóxido
- d) Determinación de los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno.

Los resultados del estudio se muestran en la Tabla 11. Los compuestos NP031111, NP031112 y NP111404 no fueron citotóxicos hasta la máxima dosis ensayada que permitía su solubilidad (4mM).

El compuesto NPE110901 no mostró toxicidad hasta la máxima dosis ensayada (19 mM) en la cepa salvaje *oxyR+* (IC188) ni en la cepa mutante *sodA- sodB-* (IC5232), pero si produjo citotoxicidad en la cepa la cepa mutante *oxyR-* (IC203), con un valor de IC50=4.28 mM. NPE100928 mostró una toxicidad similar en la cepa salvaje (IC50= 3.25 mM) y en la cepa mutante *oxyR-* (IC50= 3.75 mM), pero no se observó ningún efecto en el mutante IC5232, hasta alcanzar la máxima solubilidad (8mM) del compuesto.

En resumen, no se encontró efecto citotoxico en la cepa mutante *sodA- sodB-* (IC5232) con ninguno de los compuestos ensayados, dos compuestos NPE110901 y NPE100928 fueron citotóxicos para la cepa mutante *oxyR-* (IC203) y NPE100928 fue tóxico para las cepas mutante IC203 y para la cepa salvaje IC188.

Tabla 11. Citotoxicidad de los compuestos de Noscira ensayados en <i>E.coli</i> B.			
	CITOTOXICIDAD (IC50, mM)		
COMPUESTO	CEPAS BACTERIANAS		
	<i>Salvaje</i> IC188	<i>oxyR</i> IC203	<i>sodAB</i> IC5232
2-propanol	2600±208	1760±400	2360±340
CHP	7,61±2,09	4,75±0,84	8,18±1,66
NP031111	>4	>4	>4
NP031112	>4	>4	>4
NP111404	>4	>4	>4
NPE110901	>16	4,28±1,57	>16
NPE100928	3,25±0,90	3,75±0,99	>8

Los resultados mostrados en la Tabla 12 muestran que el compuesto NP031112 fue el único que no inhibió el crecimiento bacteriano a las concentraciones ensayadas (50 µg/disco). Todos los demás compuestos tuvieron un efecto bacteriostático sobre todas las cepas. El compuesto NPE100928 fue más bacteriostático en la cepa IC5232 que en la cepa salvaje IC188. Los compuestos NP031111, NP111404 y NPE110901 tenían un efecto similar en las tres cepas estudiadas.

Tabla 12. Efecto de los compuestos ensayados sobre el crecimiento en placa			
	INHIBICION DEL CRECIMIENTO (mm)		
COMPUESTO	CEPAS BACTERIANAS		
	<i>Salvaje</i>	<i>oxyR</i>	<i>sodAB</i>
	IC188	IC203	IC5232
NP031111	10	10	10
NP031112	6	6	6
NP111404	9	8	10
NPE110901	9	10	10
NPE100928	13	11	15

En la Tabla 13 se muestra que ningún compuesto presentaba un incremento en la generación de peróxidos. La detección de peróxidos se realizó con la sonda fluorescente DHDCF-DA. Como se esperaba, el control positivo cumeno hidroperóxido fue más efectivo en la producción de peróxidos en las cepas mutantes IC203 e IC5232 que en la cepa salvaje, con valores de EC50 inferiores a los valores de IC50 en el test citométrico de citotoxicidad.

Tabla 13. Efecto de los compuestos ensayados sobre la actividad peroxidativa			
	ACTIVIDAD PEROXIDATIVA (EC50, mM)		
COMPUESTO	CEPAS BACTERIANAS		
	<i>Wild Type</i>	<i>oxyR⁻</i>	<i>sodAB⁻</i>
	IC188	IC203	IC5232
CHP	1,58±0,04	0,51±0,27	0,73±0,06
NP031111	>4	>4	>4
NP031112	>4	>4	>4
NP1111404	>4	>4	>4
NPE110901	>16	>16	>16
NPE100928	>8	>8	>8

En la Tabla 14 se presenta los datos de la generación de O₂⁻ intracelular. La detección de superóxido se realizó con la sonda fluorescente HE. Los compuestos NP031111, NP031112 y NP1111404 no indujeron un incremento en los niveles de superóxido a las dosis ensayadas. Los compuestos NPE110901 y NPE100928 incrementaron los niveles de superóxido en la cepa mutante *oxyR⁻* (IC203) y en la cepa salvaje IC188, aunque sus respectivos valores de EC50 fueron superiores que la del control positivo cumeno hidroperóxido.

Tabla 14. Efecto de los compuestos ensayados sobre la generación del anión superóxido			
	GENERACIÓN DE SUPERÓXIDO (EC50, mM)		
COMPUESTO	CEPAS BACTERIANAS		
	<i>Salvaje</i>	<i>oxyR</i>	<i>sodAB</i>
	IC188	IC203	IC5232
CHP	1,80±0,45	1,46±0,04	2,89±0,53
NP031111	>4	>4	>4
NP031112	>4	>4	>4
NP1111404	>4	>4	>4
NPE110901	2,57±0,88	2,06±1,6	>16
NPE100928	2,36±0,59	2,42±1,4	>8

Así, como se muestra en la Tabla 15, el sistema bacteriano de biosensores de estrés oxidativo fue capaz de diferenciar por su citotoxicidad y por su toxicidad ROS-TOX todos los compuestos de suministrados por Noscira. En la Tabla 16 se muestra la clasificación de los compuestos según su toxicidad y su generación de ROS. Nuestros resultados muestran que solamente los compuestos NPE100928 y NPE110901 se pueden clasificar como pro-oxidantes, teniendo una toxicidad asociada a ROS (ROS-TOX), siendo el compuesto NPE100928 más potente como pro-oxidante que NPE110901. La toxicidad del compuesto NP100928 fue dos veces mayor que la del cumeno

hidroperóxido, pero sin embargo su capacidad de generar superóxido fue menor que la del control positivo. No se observó efecto generador de peróxidos con ningún compuesto.

Todos los compuestos excepto el NP031112 fueron bacteriostáticos en el ensayo de inhibición de crecimiento en placa en placa, y los compuestos NP031111 y NP111404 fueron los más tóxicos en este ensayo. En el ensayo en placa la incubación con los compuestos es de 24 horas, mientras que en los ensayos citométricos la incubación fue de 30 minutos. Esta diferencia en las condiciones experimentales permitiría explicar la diferencia de resultados entre el test en placa con el test de citotoxicidad por citometría de flujo.

Tabla 15 Resumen de los efectos de los compuestos ensayados en *E.coli*

COMPUESTO	Citotoxicidad (IC50)			Inhibición del crecimiento (mm)			Actividad peroxidativa (EC50)			Generación de superóxido (EC50)		
	WT	oxyR ⁻	sodAB ⁻	WT	oxyR ⁻	sodAB ⁻	WT	oxyR ⁻	sodAB ⁻	WT	oxyR ⁻	sodAB ⁻
2-propanol	2,80±0,28	1,76±0,40	2,36±0,34	--	--	--						
CHP	7,61±2,09	4,75±0,84	8,18±1,66	--	--	--	1,58±0,04	0,51±0,27	0,73±0,06	1,80±0,43	1,46±0,04	2,88±0,53
NP031111	>4	>4	>4	10	10	10	>4	>4	>4	>4	>4	>4
NP031112	>4	>4	>4	8	8	8	>4	>4	>4	>4	>4	>4
NP111404	>4	>4	>4	9	8	10	>4	>4	>4	>4	>4	>4
NPE110901	>16	4,28±1,57	>16	9	10	10	>16	>16	>16	2,57±0,88	2,06±1,6	>16
NPE100928	3,25±0,90	3,75±0,99	>8	13	11	15	>8	>8	>8	2,36±0,59	2,42±1,4	>8

Tabla 16 Clasificación de los compuestos ensayados	
Citotoxicidad	
Compuestos citotóxicos	NPE100928>NPE110901
Compuestos no citotóxicos	NP0311111 NP0311112 NP1111404
Inhibición de crecimiento en placa	
Compuestos citostáticos	NPE100928>NPE110901>NP031111~NP1111404
Compuestos no citostáticos	NP031112
Estrés oxidativo	
Compuestos inductores del anión superóxido	NPE100928~ NPE110901
Compuestos no inductores del anión superóxido	NP031111~ NP031112~NP1111404
Compuestos inductores de peróxidos	Ninguno
Compuestos no inductores de peróxidos	NPE100928 NPE110901 NP031111 NP031112 NP1111404

CONCLUSIONES

1. Se ha evaluado la cepa de *E.coli* B para el desarrollo de ensayos funcionales por citometría de flujo. En este estudio, la cepa *E.coli* B presenta una mayor permeabilidad a los fluorocromos que la cepa de *E.coli* K-12, de esta manera se pueden realizar estudios de la fisiología bacteriana en bacterias vivas no permeabilizadas.
2. El estudio por citometría de flujo de mutantes en las diferentes vías de la defensa antioxidante, OxyR y SoxRS, permite diseñar un modelo de biosensores bacterianos para detectar los niveles de estrés oxidativo y nitrosativo generados por compuestos prooxidantes, así como determinar la capacidad antioxidante de compuestos como la melatonina.
3. El modelo de biosensores bacterianos se ha aplicado al estudio de las diferencias en la generación de ROS del catecol y derivados, así como al estudio de la citotoxicidad y generación de especies reactivas en MDMA y su derivado R-(-)HHMA, pudiendo diferenciarse con nuestro sistema bacteriano la toxicidad oxidativa y la no oxidativa.
4. Se ha caracterizado por el modelo desarrollado de biosensores bacterianos la toxicidad oxidativa de una serie de compuestos candidatos en el desarrollo de un posible fármaco antiinflamatorio derivado de la molécula de Tideglusib, un inhibidor del enzima GSK3.

BIBLIOGRAFÍA

Aderem A, Underhill D (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Ann Rev Immunol* 17 593-623.

Allman R, Hann AC, Phillips AP, Martin KL, Lloyd D (1990) Growth of *Azotobacter vinelandii* with correlation of Coulter cell size, flow cytometric parameters and ultrastructure. *Cytometry* 11 822–831.

Altuvia S, Weinstein-Fischer D, Zhang A, Postow L, Storz G. (1997) A small stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell* 90 43–53.

Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Canton R, Nombela C, Sanchez-Perez M (2000) Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 13 167-195.

Anderson G. M, Braun G, Braun U, Nichols D. E, and Shulgin A. T. (1978) Absolute Configuration and Psychotomimetic Activity, in *Quasar Research Monograph 22* (Barnett, G., Trisc, M., and Willette, R., Eds.) pp 8-15, National Institute on Drug Abuse, Washington, DC.

Andrews S.C, Robinson A., Rodriguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27 215–237.

Araujo A, Astrakhantseva I, Fields HA, Kamili S (2011). Distinguishing acute from chronic hepatitis C virus infection based on antibody reactivities to specific HCV structural and nonstructural proteins *J Clin Microbiol* 49 34-57.

Banchard JL, Wholey W-Y, Conlon EM, Pomposiello P.J (2007) Rapid Changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal

SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. PLoS One 14(2):e1186.

Barbosa J, Bragada C, Costa-de-Oliveira S, Ricardo E, Rodrigues A.G, Pina-Vaz C. (2010). A new method for the detection of *Pneumocystis jirovecii* using flow cytometry. European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases 29 1147-1152.

Barnham K, Masters C, Busch AJ (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress Nature Review Drug discovery 3 205-214.

Battacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe S E (2014) Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases Physiol Rev 94 329-354.

Becker-Hapak M., Eisenstark A (1995) Role of *rpoS* in the regulation of glutathione oxidoreductase (*gor*) in *Escherichia coli* FEMS Microbiol. Lett. 134 39–44.

Berkels R, Dachs C, Roesen R, Kaus W (2000) Simultaneous measurement of intracellular Ca(+2) and nitric oxide: a new method. Cell calcium 27 281-286.

Besmer M, Weissbrodt D, Kratochvil B, Sigrist J, Weyland M Hammes (2014) The feasibility of automated online flowcytometry for in-situ monitoring of microbial dynamics in aquatic ecosystems. Frontiers of microbiology system microbiol 5 1-12.

Bielski B.H.J, Arudi R.L, Sutherland M.W. (1983) A study of the reactivity of HO₂/O₂ with unsaturated fatty acids. J Biol Chem 258 4758-4761.

Blanco M, Martinez A, Urios A, Herrera G, O'Connor JE.(1998) Mutagenesis by isoniazid and other hydrazine derivatives in Escherichia coli WP2 tester strain IC203, deficient in OxyR, and IC206, deficient in MutY: strong protective of rat liver S9. *Mutat Res* 417 39–46.

Blanco M, Herrera G, Urios A (1995). Increased mutability by oxidative stress in OxyR-deficient Escherichia coli and Salmonella typhimurium cells: clonal occurrence of mutants during growth on nonselective media. *Mutat Res Lett* 346 215-229.

Borisov VB, Forte E, Davletshin A, Mastronicola D, Sarti P, Giuffr  (2013) A Cytochrome bd oxidase from Escherichia coli display high catalase activity: an additional defense against oxidative stress *FEBS Letters* 587 2214-2218.

Bouchez J.C, Cornu M, Danzart M, Leveau J.Y, Duchiron F, Bouix M. (2004) Physiological significance of the cytometric distribution of fluorescent yeast after viability staining. *Biotechnol. Bioeng.* 86 520–530.

Bradner J.R, Nevalainen K.M.-H (2003) Metabolic activity in filamentous fungi can be analysed by flow cytometry *J. Microbiol. Methods* 54 193–201.

Brehm-Stecher BE, Johnson EA. (2004) Single-cell microbiology, technologies and applications *Microbiol Mol Biol Rev* 68 538-559.

Brognaux A Sorensen S, Lebeau F Thonart P, Delvigne F (2013) A low-cost multiplexable automated flow cytometry procedure for the

characterization of microbial stress dynamics in bioreactors. *Microbial cell factories* 12 100.

Brussaard C (2004) Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry *App Environ Microbiol* 70: 1506-1513.

Bunthof C, Abee, J. T (2002) Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 2934–2942.

Calhoun LN, Kwon YM (2011) Structure, function and regulation of DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *E.coli*: a review. *J Appl Microbiol* 110 375-386.

Capela, J. P, Carmo H, Remiao F, Lourdes Bastos M, Meisel A, Carvalho F. (2009) Molecular and cellular mechanisms of ecstasy-induced neurotoxicity: an overview. *Mol. Neurobiol.* 39 210–271.

Chen Z, Lewis K.A, Shultzaberger R.K, Lyakhov I, Zheng M, Doan B, Storz G, Schneider T.D (2007) Discovery of Fur binding site cluster in *Escherichia coli* by information theory models *Nucleic Acids Res.* 35 6762–6777.

Chiancone E, Ceci P. (2010). The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding. *Biochim. Biophys. Acta* 1800 798–805.

Choi H, Kim S, Mukhopadhyay P, Cho S, Woo J, Storz G, Ryu S.E (2001) Structural basis of redox switch in the OxyR transcription factor *Cell* 105 103–113.

Christman M.F, Storz G, Ames B.N (1989) OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 3484–3488.

Christman M.F, Morgan R., Jacobson F.S, Ames B.N (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium* *Cell* 41 753–762.

Clarke R. G, Pinder A. C. (1998) Improved detection of bacteria by flow cytometry using a combination of antibody and viability markers. *J. Appl. Microbiol.* 84 577–584.

Cornelis P, Wei Q, Andrews S.C, Vinckx T (2011) Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics* 3 540–549.

Cruz-Ramos H, Wu C, Hughes M.N, Scott C, Thomson A.J, Green J., Poole R.K. (2002) NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin Hmp. *The EMBO Journal* 21 3235-3244.

Cunningham L, Gruer MJ, Guest JR (1997) Transcriptional regulation of aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. *Microbiology* 143 3795–805.

D'Autréaux B, Touati D, Bersch B, Latour JM, Michaud-Soret I (2002) Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *PNAS* 99 16619-16624.

Davey H.M., (2002) Flow cytometry techniques for the detection of microorganisms *Meth. Cell Sci.* 24 91–97.

Demple B, Harrison L (1994) Repair of oxidative damage to DNA: *Enzymology and Biology. Annu. Rev. Biochem* 63 915-948.

Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C (2010) Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 48 385–407.

Dominguez JM, Fuertes A, Orozco L, del Monte-Millán M, Delgado E, Medina M (2012). Evidence for irreversible inhibition of glycogen synthase kinase -3 by tideglusib. *J.Biol.Chem* 287 893-904.

Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function *Physiol Rev* 82 47-95.

Erives G. V, Lau S. S, and Monks T. J. (2008) Accumulation of neurotoxic thioether metabolites of 3,4-((1)-methylenedioxy)amphetamine in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324 284–291.

Esteban B, O'Shea E, Camarero J, Sanchez V, Green A. R, Colado M.I (2001) 3,4-Methylenedioxyamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose. *Psychopharmacology* 154 251–260.

Felim A, Herrera G, Neudorffer A, Blanco M, O'Connor JE, Largeron M (2010) Synthesis and in vitro cytotoxicity profile of the R-rnantiomer of 3,4-dihydroxymethamphetamine (R-(-)-HHMA): comparison with related catecholamines *Chem Res Toxicol* 23 211-219.

Felim A, Urios A, Neudorffer A, Herrera G, Blanco M, LARGERON M (2007) Bacterial Plate assays and electrochemical methods: An efficient tandem for evaluating the ability of catechol-thioether metabolites of MDMA ("Ecstasy") to induce toxic effects through redox-cycling. *Chem. Res. Toxicol.* 20 685-693.

Flint S, Walker K, Waters B, Crawford R (2007) Description and validation of a rapid (1 h) flow cytometry test for enumerating thermophilic bacteria in milk powders. *J. Appl. Microbiol.* 102 909–915.

Frey A, Farres J, Christian J, Bollinger T, Kallio P (2002) Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 4835-4849.

Fridovich I (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology* 210 1203-1209.

Fuchslin H.P, Kötzsch S, Keserue H.A, Egli T. (2010). Rapid and quantitative detection of *Legionella pneumophila* applying immunomagnetic separation and flow cytometry. *Cytometry* 77 264-274.

Ghezzi P, Bonetto V. (2003) Redox proteomics: Identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* 3 1145-1153.

Goni-Allo B, Puerta E, Mathuna B. O, Hervias I, Lasheras B, de la Torre R, and Aguirre N. (2008) On the role of tyrosine and peripheral metabolism in 3,4-methylenedioxymethamphetamine induced serotonin neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology* 54 885–900.

Gralnick J, Downs D (2001) Protection from superoxide damage associated with an increased level of the YggX protease in *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 8030–8035.

Grant RA, Filman DJ, Finkel SE, Kolter R, Hogle JM. (1998) The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat. Struct. Biol.* 5 294–303.

Greenberg J.T, Monach P, Chou J.H, Joseph P.D, Dimple B (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 6181–6185.

Greenberg JB, Dimple B (1986) Glutathione in *Escherichia coli* is dispensable for the resistance to H₂O₂ and gamma irradiation, *J Bacteriol* 168 1026-1029.

Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD (1985) Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100 965–973.

Greve , Weidner J, Cassens U, Odaibo G, Olaleye D, Sibrowski W, Reichelt D, Nasdala I, Göhde W. (2009). A New Affordable Flow Cytometry Based Method to Measure HIV-1 Viral Load. *Cytometry* 75 199-206.

Gros L, Saparbaev M.K, Laval L (2002) Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* 21 8905-8925.

Günther S, Hübschmann T, Rudolf M, Eschenhagen M, Röske I, Harms H, Müller S. (2008) Fixation procedures for flow cytometric analysis of

environmental bacteria *Journal of Microbiological Methods* 75 127–134.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell cultures: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142 231-252.

Hantke K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4 172-177.

Henchcliffe C, Beal M (2008) Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis *Nature Clin Practice Neurology* 4 600-609.

Henriques ST, Thorstholm L, Huang Y, Getz J, Daugherty P, Craik D (2013) A novel quantitative kinase assay using bacterial surface display and flow cytometry *PLOS One* 8:e80474.

Hermes-Lima (2004) *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals*. In: Storey, K.B., Ed., *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 319-368.

Herrera G, Urios A, Alexandre V, Blanco M. (1993) Mutability by polycyclic hydrocarbons is improved in derivatives of *Escherichia coli* WP2 *uvrA* with increased permeability. *Mutat Res* 301 1–5.

Herrera G, Martínez A, Blanco M, O'Connor JE (2002) Assessment of *Escherichia coli* B with enhanced permeability to fluorochromes for flow cytometric assays of bacterial cell function 49 62-69.

Hewitt CJ, Nebe-von Caron G, Nienow AW, McFarlane CM. (1999) The use of multiparameter flow cytometry to compare the physiological

response of *Escherichia coli* W3110 to glucose limitation during batch, fed-batch and continuous culture cultivations. *J Biotechnol* 75 251–264.

Hewitt CJ, Nebe-Von-Caron G (2001). An industrial application of multiparameter flow cytometry: assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. *Cytometry* 44 179–187.

Hidalgo E, Demple B. (1994) An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by redox-sensing SoxR protein, *EMBO J.* 13 138–146.

Hidalgo E, Bollinger J.M, Bradley T.M, Walsh C.T, Demple B (1995) Binuclear [2Fe-S] clusters in *Escherichia coli* SoxR protein and role of metal centers in transcription. *J. Biol. Chem.* 270 20908–20914.

Hidalgo E., Demple B (1997) Spacing of promoter elements regulates the basal expression of *soxS* gene and converts SoxR from a transcriptional activator into a repressor *EMBO J* 16 1056-1065

Hutchings M.I, Mandhana N, Spiro S (2002) The NorR protein of *Escherichia coli* activates expression of the flavin monooxygenase gene *norV* in response to reactive oxygen species. *J Bacteriol* 184 4640-4643.

Hutter K.J (2002) Flow cytometry: a new tool for direct control of fermentation processes, *J. Inst. Brew.* 108 48–51.

Imlay J.A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57 395-418.

Imlay JA (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide *Annu Rev Biochem* 77 755-776.

Imlay JA (2011) The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than superoxide. *Mol Microbiol* 79 1136-1150.

Imlay JA (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium *Nature Rev Microbiol* 11 443-454.

Imlay JA (2015) Transcription factors that defend bacteria against reactive oxygen species *Annu Rev Microbiol* 69 93-104.

Janse C.J, Van Vianen P.H. (1994). Flow cytometry in malaria detection. *Methods in Cell Biology*. 42 295–318.

Jansson PE, Lindberg AA, Lindberg B, Wollin R. (1981) Structural studies on the hexose region of the core in lipopolysaccharides from *Enterobacteriaceae*. *Eur J Biochem* 115 571–577

Jernaes MW, Steen HB. (1994) Staining of *Escherichia coli* for flow cytometry: influx and efflux of ethidium bromide. *Cytometry* 17 302–309.

Jones D. C, Duvauchelle C, Ikegami A, Olsen C. M, Lau, S. S, de la Torre R, Monks T. J. (2005) Serotonergic neurotoxic metabolites of ecstasy identified in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313 422–431.

Justino MC, Almeida CC, Teixeira M, Saraiva LM (2007) *Escherichia coli* di-iron YtfE protein is necessary for the repair of stress-damage iron-sulfur clusters. *J Biol Chem* 282 10352–9.

Kato S, Kurihara M, Takahashi Y, Toyumoto U, Yoshimura T, Esaki N (2002) N Cys-328 of IscS and Cys-63 of IscU are the sites of disulfite bridge formation in a covalently bound IscS/IscU complex: implications for the mechanism of iron-sulfur cluster assembly. PNAS 99 5948-5952.

Katsu T, Kobayashi H, Fujita Y (1986) Mode of action of gramicidin S on *Escherichia coli* membrane. Biochim Biophys Acta 860 608–619.

Kawai T Akira S (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity 34637-650.

Kim S.Y, Kim E.J, Park J.W (2002) Control of singlet oxygen-induced oxidative damage in *Escherichia coli* J. Biochem. Mol. Biol. 35 353–357.

Kim J.S, Anderson G.P, Erickson J.S, Golden J.P, Nasir M, Ligler F.S. (2009). Multiplexed detection of bacteria and toxins using a microflow cytometer. Analytical Chemistry. 81 5426–5432.

Kobayashi K, Tagawa S, (1999) Isolation of reductase for SoxR that governs an oxidative response regulon from *Escherichia coli* FEBS Lett. 451 227–230.

Koo MS, Lee JE, Rah S-YX Yeo WS Lee K-L, Koh YS, Kang S-O, Roe J-H (2003) A reducing system of the superoxide sensor SoxR in *Escherichia coli*. 2003. Embo J 22 2614-2622.

Kovalevich J, Langford D. (2013) Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. Methods Mol Biol 1078 9-21.

Kramer G.F, Ames B.N. (1987) Oxidative mechanisms of toxicity of low-intensity near -UV light in *Salmonella typhimurium*, J. Bacteriol. 169 2259–2266.

Kullik, I, Stevens J, Toledano M.B., Storz G. (1995) Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization J. Bacteriol. 177 1285–1291.

Li H Horke S Forstermann U (2014) Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. Atherosclerosis 237 208-219.

Libertin C.R, Woloschak G.E, Wilson W.R, Smith, T.F. (1984). Analysis of *Pneumocystis carinii* cysts with a fluorescence-activated cell sorter. Journal of Clinical Microbiology. 20 877–880.

Liochev S.I, Benov L, Touati D, Fridovich I (1999) Induction of the soxRS Regulon of *Escherichia coli* by superoxide J. Biol. Chem. 274 9479–9481.

Liochev SI, Fridovich I (1992) Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the soxRS regulon. Proc Natl Acad Sci USA 89 5892–5896.

Liu Y, Bauer SC, Imlay JA (2011) The YaaA protein of the *Escherichia coli* OxyR Regulon lessens hydrogen peroxide toxicity by diminishing the amount of intracellular unincorporated iron. J.Bacteriol 193 2186-2196.

Lochfelmt.W, Luke N.R, Campagnari A.A. (2008). Identification and Characterization of an *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein. *Journal of Bacteriology*. 190 1036–1044.

Loewen P.C, Triggs B.L, George C.S,Hrabarchuk B.E (1985) Genetic mapping of *katG*, a locus that affects synthesis of the bifunctional catalase-peroxidase hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 162 661–667.

Lopes da Silva T, Roseiro JC (2012) Applications and perspectives of multiparameter flow cytometry to microbial biofuels production processes. *Trends in Biotechnology* 30 225-232.

Lopez-Amoros R, Castel S, Comas-Riu J, Vives-Rego J. (1997) Assessment of *E. coli* and *Salmonella* viability and starvation by confocal laser microscopy using rhodamine 123, DiBAC4(3), propidium iodide, and CTC. *Cytometry* 29 298–305.

Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Avila J (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau, piperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice *EMBO J* 15 27-39.

Malki L, Yanku M, Borovok I, Cohen G, Meravech M, Aharonowitz (2009) Identification and characterization of *gshA*, a gene encoding the glutamate-cysteine ligase in the halophilic archeon *Haloferax volcanii* *J Bacteriol* 191 5196-5204.

Manchado M, Michan C, Pueyo C (2000) Hydrogen peroxide activates the SoxRS regulon in vivo *J. Bacteriol*. 182 6842–6844.

Martinez A, Urios A, Blanco M. (2000) Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in OxyR, and its oxyR+ parent WP2 uvrA/pKM101: detection of 31 oxidative mutagens. *Mutat. Res.* 467 41–53.

Martinez CM, Neudorffer A, Largeron M (2012). A convenient biomimetic synthesis of optically active putative neurotoxic metabolites of MDMA (“ecstasy”) from R-(-) and S-(-) N-methyl- α -methyl-dopamine precursors. *Org Biomol Chem* 10 3739.

Masip L, Veeravalli K, Georgiu G (2006) The many faces of glutathione in bacteria. *Antiox Redox signal* 6 753-762.

Melin P, Hakansson S, Eberhard T.H, Schnürer J. (2006) Survival of the biocontrol yeast *Pichia anomala* after long-term storage in liquid formulations at different temperatures, assessed by flow cytometry, *J. Appl. Microbiol.* 100264–271.

Messner KR, Imlay JA (2002) Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem* 277 43563-42571.

Meyer, M. R., and Maurer, H. H. (2009) Enantioselectivity in the methylation of the catecholic phase I metabolites of methylenedioxy designer drugs and their capability to inhibit catechol-O-methyltransferase-catalyzed dopamine 3-methylation. *Chem. Res. Toxicol.* 22 1205–1211.

Meyer, M. R., Peters, F. T, and Maurer, H. H. (2008) The role of human hepatic cytochrome P450 isoenzymes in the metabolism of racemic 3,

4-methylenedioxyamphetamine and its enantiomers. *Drug Metab. Dispos.* 36 2345–2354.

Michan C, Manchado M, Dorado G, Pueyo C (1999) In vivo transcription of *Escherichia coli* oxyR regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress. *J. Bacteriol.* 181 2759–2764.

Michelsen O, Cuesta-Dominguez A, Albrechtsen, B, Jensen P.R, (2007) Detection of bacteriophage-infected cells of *Lactococcus lactis* using flow cytometry, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 7575–7581.

Milhazes N, Cunha-Oliveira T, Martins P, Garrido J, Oliveira C, Rego A. C, and Borges F. (2006) Synthesis and cytotoxic profile of 3,4-methylenedioxyamphetamine (“ecstasy”) and its metabolites on undifferentiated PC12 cells: a putative structure-toxicity relationship. *Chem. Res. Toxicol.* 19 1294–1304.

Millard P, Roth B, Truong H Yue S, Haugland P(1997) Development of the fun-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeast *App Environ Microbiol* 63 2897-2905.

Mills S.A, Marletta M.A (2005) Metal binding characteristics and role of iron oxidation in the ferric uptake regulator from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 44 13553–13559.

Mitchell M, Hudspeth M, Wright A. (2005) Flow cytometry susceptibility testing for the antifungal caspofungin *J Clin Microbiol* 43 2586-2589.

Monks T. J, Jones D. C, Bai F, and Lau S. (2004) The role of metabolism in 3, 4-((-)-methylenedioxyamphetamine and 3,4-((-)-

methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) toxicity. *Ther. Drug Monit.* 26 132–136.

Moore, H. W. (1977) Bioactivation as a model for drug design bioreductive alkylation. *Science* 197 527–532.

Mueller S, Davey, H. (2009). Recent Advances in the analysis of individual microbial cells. *Cytometry.* 75 83-85.

Muro M, Izumi K, Imai T T, Ogawa, Ohkochi M (2006) Yeast cell cycle during fermentation and beer quality, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 64 151-154.

Neto J, da Silva C, Junior H (2014) Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against fluconazole-resistant strains of different *Candida* Species: A special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis* *PLOS One* 9 e93698.

Nunoshiba T, Rojas-Walker T, Wishnok J.S, Tannenbaum S.R, Demple B (1993) Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 9993–9997.

Nyström T (2004) Stationary-phase physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 58 161-181.

O'Connor JE, Kimler BF, Morgan MC, Tempas KJ (1998) A flow cytometric assay for intracellular nonprotein thiols using mercury orange. *Cytometry* 9 529-532.

O'Connor JE, Callaghan RC, Escudero M, Herrera G, Martinez A, Monteiro MD, Montoliu H (2001) The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life* 51 231–239.

Oktyabrsky ON, Smirnovam, Muzyka NG (2001) Role of glutathion in regulation of hidropoxidase I in growing *Escherichia coli*. *Free Radical Biology and Medicine* 31 250-255.

Organization for Economic Cooperation and Development (1998) OECD guideline for testing of chemicals: bacterial reverse mutation test. In: Environment Directorate, editors, Ninth addendum to the OECD guidelines for the testing of chemicals. OECD, France p. 1–11.

Outten F, Djaman O, Storz G (2004) A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli* *Molec. Microbiol* 52 861-872.

Page B.T., Kurtzman C.P. (2005). Rapid identification of *Candida* species and other clinically important yeast species by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 43 4507–4514.

Pianetti A, Falcioni T, Bruscolini F, Sabatini L, Sisti E, Papa, S. (2005). Determination of the viability of *Aeromonas hydrophila* in different types of water by flow cytometry, and comparison withc methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 7948–7954.

Pieretti B, Masucci A, Moretti M (2012) Applications of flow cytometry to clinical microbiology. 17-42 Ed Ingrid Schmid in *Clinical flow cytometry –emerging applications*.

Plesiat P, Vaara M (1999). Outer membrane permeability of the antibiotic-supersusceptible lipid A mutants of *Escherichia coli* to hydrophobic steroid probes. *J Antimicrob Chemother* 43 608–61.

Pomposiello PJ, Koutsolioutsou A, Carrasco D, Demple B (2003). SoxRS-regulated expression and genetic analysis of *yggX* gene of *Escherichia coli* *J Bacteriol* 185 6624–6632.

Prigione V, Lingua G, Filipello Marchisio V. (2004). Development and use of flow cytometry for detection of airborne fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 1360–1365.

Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z (2003) Melatonin as antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans *Acta Biochimica Polonica*. 50 1129-1146.

Rice-Evans C. A, Miller N. J, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20 933–956.

Ritz D, Beckwith J (2001) Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55 21-48.

Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antoli I, Herrera F, Martin V, Reiter R.J (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin *J.Pineal Res* 2004 36.1-9.

Rodriguez S.B, Thornton R.J (2008) Use of flow cytometry with fluorescent antibodies in real-time monitoring of simultaneously

inoculated alcoholic malolactic fermentation of Chardonnay, *Lett. Appl. Microbiol.* 46 38–44.

Roobsoon W, Maher S, Rachaphaew N, Barnes S, Williamson K, Sattabongkot J, Adams J (2014) A rapid sensitive, flow cytometry-based method for the detection of *Plasmodium vivax*-infected blood cells. *Malaria J* 13 55.

Rothe G, Valet G (1990). Flow cytometric analysis of respiratory burst in phagocytes with hydroethidine and 2,7-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol.* 47 440–448.

Ruszczynska A, Sztejn J, Wiszniewska-Laszczych A. (2007) Flow cytometry as a method for the evaluation of raw material, product and process in the dairy industry. *Pol J Vet Sci* 10 119-121.

Santilli I, Prella A, Geremia L, Scarlato G, Meola G. (1989) Nile Red simultaneous staining of intracellular lipids and membrane network in human muscle cultures. *Basic Appl Histochem* 33 49–52.

Schrammel A, Pfeiffer S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. (1998) Activation of soluble guanylyl cyclase by nitrovasodilator 3-morpholinonydnonimin involves formation of S-nitrosoglutathione. *Molecular Pharmacol* 54 207-212.

Seaver L.C, Imlay J.A, (2001) Hidroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli* J. *Bacteriol.* 183 7173–7181.

Seaver L.C, Imlay JA (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183 7173-7181.

Segura M, Jordi O, Farre´ M, McLure J. A, Pujadas M, Pizarro N, Llebaria A, Joglar J, Roset P. N, Segura J, de la Torre R. (2001) 3,4-Dihydroxymethamphetamine (HHMA). A major in vivo 3, 4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) metabolite in humans. *Chem. Res Toxicol* 14 1203 -1208.

Serenó L, Coma M, Rodriguez M, Sanchez-Ferrer P, Sanchez MB, Gich I, Agulló JM, Pérez M, Avila J, Guardia-Laguarta C, Clarimón J, Lleó A, Gómez-Isla T. (2009) A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol Dis.* 35 359-367.

Seth D, Hausladen A, Wang YJ, Stamler JS. (2012) Endogenous protein S-nitrosylation of *E. coli*: regulation by OxyR. *Science* 336 470–73

Shapiro HM, Nebe-von-Caron (2004) Multiparametric flow cytometry of bacteria. *From Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols* ed Hawley and Hawley.

Sheng Y, Abreu I, Cabelli D, Maroney M X, Miller AF, Teixeira M, Valentine JS (2014) Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem. Rev.* 114 3854–3918.

Siedler S, Schendzierlorz G, Binder S, Eggeling L, Bringer S, Bott M (2014) SoxR a single-cell biosensor for NADPH-consuming enzymes in *Escherichia coli*. *ACS Synthetic biology* 3 41-47.

Spiekermann P, Rehm BH, Kalscheuer R, Baumeister D, Steinbuchel A. (1999) A sensitive, viable-colony staining method using Nile Red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch Microbiol* 171 73–80.

Spiro S. (2006) Nitric oxide-sensing mechanisms in *Escherichia coli* *Biochemical Society Transactions* 34 200-202.

Staudinger B.J, Oberdoerster M.A, Lewis P.J, Rosen H (2002) mRNA expression profiles for *Escherichia coli* ingested by normal and phagocytosed oxidase-deficient human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 110 1151–1163.

Stich H. F (1991) The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. *Mutat. Res.* 259 307–324.

Stringaro A, Molinari A, Calcabrini A, Arancia G, Ceddia P, Cianfriglia M, Poloni F, Mondello F, Angiolella L, de Bernardis F, Cassone A (2002) Detection of human P-glycoprotein-like molecule in azole-resistant *Candida albicans* from HIV+ patients. *Microbial drug resistance* 8 235-244.

Tan DX Reiter RJ, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden (1994). Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adducts formation induced by the carcinogen safrole *Carcinogenesis* 15 215-218.

Tarpey MM, Fridovich I. (2001) Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 89:224–236.

Thorell B. (1983) Flow-cytometric monitoring of intracellular flavins simultaneously with NAD(P)H levels *Cytometry* 4 61–65.

Toledano M.B, Kullik I, Trinh F, Baird PT, Schneider TD, Storz G (1994) Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection *Cell* 78 897–909.

Touati D. (2000) Sensing and protecting against superoxide stress in *Escherichia coli* – how many ways are there to trigger soxRS response? *Redox Report* 5 287-293.

Tsaneva I.R, Weiss B. (1990) SoxR, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 172 4197–4205.

Urios A, Lopez-Gresa P, Gonzalez C, Primo J, Martinez A, Herrera G, Escudero JC, O'Connor JE, Blanco M (2003) Nitric oxide promotes strong cytotoxicity of phenolic compounds against *Escherichia coli*: the influence of antioxidant defenses.

Urios A, Martinez A, Blanco M. (1998) New *E. coli* WP2 tester strains highly sensitive to reversion by oxidative mutagens. *Mutat Res* 413 95–101.

Urios A., Lopez-Gresa., MP Gonzalez., MC Primo J., Martínez A., Herrera G. Escudero JC., O'Connor JE., Blanco M (2003) Nitric oxide promotes strong cytotoxicity of phenolic compounds against *Escherichia coli*: the influence of antioxidant defenses *Free Radic Biol Med* 35 1373-1381

Urios, A., Largeron, M., Fleury, M.-B., and Blanco, M. (2006) A convenient approach for evaluating the toxicity profiles of *in vitro*

neuroprotective alkylaminophenol derivatives. *Free Radical Biol. Med.* 40 791–800.

Waleh N. S., Rapport S. J, Mortelmans K. (1982) Development of a toxicity test to be coupled to the Ames Salmonella assay and the method of construction of the required strains. *Mutat. Res.* 97 247–256.

Wardman P (2008). Methods to measure the reactivity of peroxynitrite-derived oxidants toward reduced fluoresceins and rhodamines. *Methods Enzymol* 441 261-282.

Williams I, Paul F, Lloyd D, Jepras R, Critchley I, Newman M, Warrack J, Giokarini T, Hayes AJ, Randerson PF, Venables WA. (1999) Flow cytometry and other techniques show that *Staphylococcus aureus* undergoes significant physiological changes in the early stages of surface-attached culture. *Microbiology* 145 1325–1333.

Winterbourn C.C., Metodewa D. (1994) The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 314 284-290.

Wu J., Weiss B. (1991) Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 173 2864–2871.

www.oecd-ilibrary.org

Yang H-C Mikami Y, Taguchi H Nishimura K, Miyaji M, Moreti Baranchini ML (2001). Extrusion of fluorescein diacetate by multidrug-resistant *Candida albicans*. *Mycoses* 44 368-374.

Yoon S.J, Park J.E, Yang J.H, Park J.W (2002) OxyR regulon controls lipids peroxidation-mediated oxidative stress in Escherichia coli. J. Biochem. Mol. Biol. 35 297–301.

Zhao C, Ceci P, Ilari A, Giangiacomo L, Laue T.M, Chiancone E, Chasteen N (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. The Journal of Biological Chemistry 277 27689-27696.

Zheng M, Wang X Templeton JL, Smulski DR LaRossa RA, Storz G (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of Escherichia coli response to hydrogen peroxide. J.Bacteriol 183 4562-4570.

Zheng M., Aslund F., Storz G (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfite bond formation Science 279 1718–1721.

Zheng M., Doan B., Schneider T., Storz G (1999) OxyR and SoxRS regulation of fur. J Bacteriol 181 4639–4643.