



TESIS DOCTORAL

Reposicionamiento de fármacos para el tratamiento de infecciones causadas por bacilos gramnegativos multirresistentes

Andrea Miró Canturri

Sevilla 2020

Director 1: Jerónimo Pachón Díaz

Director 2: Younes Smani

Programa de Doctorado de Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica

Departamento de Medicina

Universidad de Sevilla



Departamento de Medicina

El Dr. Jerónimo Pachón Díaz, Profesor Emérito de Medicina de la Universidad de Sevilla, como Director y Tutor de la Tesis Doctoral y el Dr. Younes Smani, investigador del programa Miguel Servet del Instituto de Salud Carlos III, como Director de la Tesis Doctoral,

CERTIFICAN:

Que la Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título **“Reposicionamiento de fármacos para el tratamiento de infecciones causadas por bacilos gramnegativos multirresistentes”** ha sido realizada por la Graduada Andrea Miró Canturri bajo nuestra supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden la presente certificación en Sevilla, 22 de mayo de 2020.

Jerónimo Pachón Díaz

Director y Tutor

Younes Smani

Director

FINANCIACIÓN TESIS DOCTORAL

Programa Miguel Servet del Instituto de Salud Carlos III y Ministerio de Economía y Competitividad.

Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III. Proyecto de Investigación en Salud PI16/01378. “Eficacia terapéutica de la oxiclozanida como terapia combinada con colistina *in vitro* y en modelos experimentales murinos de infecciones graves”.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADA CON LA TESIS DOCTORAL

Publicaciones

1. **Miró-Canturri A***, Ayerbe-Algaba R*, Smani Y. Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 41.
* Los autores han contribuido de igual manera
2. **Miró-Canturri A**, Ayerbe-Algaba R, Rodríguez-Villodres Á, Pachón J, Smani Y. Repositioning rafoxanide drug to treat Gram-negative bacilli infections. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Apr 2;pii:dkaa103. doi: 10.1093/jac/dkaa103 [ahead of print].

Comunicaciones en congresos

1. **Miró-Canturri A**, Ayerbe-Algaba R, Parra-Millán R, Pachón-Ibáñez ME, Pachón J, Smani Y. *In vitro* activity of rafoxanide in combination with colistin against colistin-susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. 11th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*. Sevilla, España 2017.
2. Ayerbe-Algaba R*, **Miró-Canturri A***, Pachón-Ibáñez ME, Pachón J, Smani Y. Tamoxifen as repurposing drug for *Acinetobacter baumannii* infections therapy: *in vitro* and *in vivo* approaches. 11th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*. Sevilla, España 2017.
* Los autores han contribuido de igual manera
3. **Miró-Canturri A**, Ayerbe-Algaba R, Pachón-Ibáñez ME, Pachón J, Smani Y. *In vitro* and *in vivo* activity of rafoxanide in combination with colistin against *Acinetobacter baumannii* infection. 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Amsterdam, Holanda 2019.

4. **Miró-Canturri A**, Ayerbe-Algaba R, Vila-Domínguez A, Pachón-Ibáñez ME, Jiménez-Mejías ME, Pachón J, Smani Y. Tamoxifen metabolites as repurposing drug against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. 12th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*, Frankfurt, Alemania 2019.
5. **Miró-Canturri A**, Ayerbe-Algaba R, Pachón-Ibáñez ME, del Toro R, Pachón J, Smani Y. Reposicionamiento del tamoxifeno para combatir infecciones causadas por bacilos gramnegativos multirresistentes. XII Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas. Sevilla, España 2019.

Otras publicaciones relacionadas con la línea de investigación

1. Ayerbe-Algaba R, Gil-Marqués ML, **Miró-Canturri A**, Parra-Millán R, Pachón-Ibáñez ME, Jiménez-Mejías ME, Pachón J, Smani Y. The anthelmintic oxyclozanide restores the colistin activity in colistin-resistant Gram-negative bacilli. *Int. J. Antimicrob Agents* 2019; 54(4): 507-512.
2. Vila-Domínguez A*, Ayerbe-Algaba R*, **Miró-Canturri A**, Rodríguez-Villodres Á, Smani Y. Antibacterial activity of colloidal silver against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Antibiotics (Basel)* 2020; 9(1): 36.
* Los autores han contribuido de igual manera
3. Gil-Marqués ML, Smani Y, Labrador-Herrera G, **Miró-Canturri A**, Pachón J, Pachón-Ibáñez ME. Role of PstS on the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* under microaerobiosis and normoxia. *J. Infect. Dis.* 2020 Apr 23;:jjaa201. doi: 10.1093/infdis/jiaa201 [ahead of print].

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIACIONES	4
LISTAS DE FIGURAS & TABLAS	8
RESUMEN	10
I. INTRODUCCIÓN	13
1. Situación actual de la resistencia antimicrobiana	14
2. Infecciones asociadas a la atención sanitaria	19
3. Bacilos gramnegativos (BGN): Epidemiología, resistencia antimicrobiana, opciones terapéuticas y virulencia	20
3.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	21
3.1.1 Epidemiología	21
3.1.2 Mecanismos de resistencia antimicrobiana	23
3.1.2.1 Enzimas β -lactamasas	24
3.1.2.2 Enzimas modificadoras de aminoglucósidos	25
3.1.2.3 Bombas de flujo	25
3.1.2.4 Defectos en la permeabilidad	26
3.1.2.5 Modificación de la diana	26
3.1.3 Tratamientos actuales	27
3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
3.2.1 Epidemiología	29
3.2.2 Mecanismos de resistencia antimicrobiana	31
3.2.2.1 Mecanismos de resistencia intrínsecos	31
3.2.2.2 Mecanismos de resistencia adquiridos	32
3.2.2.3 Mecanismos de resistencia adaptativos	34
3.2.3 Tratamientos actuales	35
3.3 <i>Enterobacteriales: Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae.</i>	37
3.3.1 Epidemiología	37
3.3.2 Mecanismos de resistencia antimicrobiana	39
3.3.2.1 Enzimas β -lactamasas	39
3.3.2.2 Enzimas modificadoras de aminoglucósidos	40
3.3.2.3 Bombas de flujo	40
3.3.2.4 Defectos en la permeabilidad	40
3.3.2.5 Modificación de la diana	41
3.3.3 Tratamientos actuales	41
3.4 Factores de virulencia de los BGN	43

ÍNDICE DE CONTENIDOS

3.4.1	Componentes de la membrana externa	43
3.4.2	Fosfolipasas	45
3.4.3	Sistemas de secreción	45
3.4.4	Toxinas	46
3.4.5	Vesículas de la membrana externa	46
3.4.6	Sideróforos (quelantes de metales)	47
3.4.7	Motilidad	47
3.4.8	Formación de <i>biofilm</i>	48
3.4.9	<i>Quorum sensing</i>	49
4.	Sistema inmune e infección	52
4.1	Papel de la inmunidad innata y adaptativa	52
4.2	Células de la inmunidad innata	54
4.2.1	Neutrófilos	54
4.2.2	Macrófagos	54
4.2.3	Monocitos	55
4.2.3.1	Monocitos inflamatorios Ly6C ^{hi}	55
4.2.3.2	Monocitos residentes Ly6C ^{low}	55
4.2.3.3	Monocitos intermedios Ly6C ^{int}	56
4.2.4	Células dendríticas	56
4.2.4.1	Células dendríticas convencionales	56
4.2.4.2	Células dendríticas plasmocitoides	57
4.2.4.3	Células dendríticas derivadas de monocitos	57
4.2.4.4	Células de Langerhans	57
4.3	Maduración y migración de las células de la inmunidad innata	59
4.3.1	Maduración en la médula ósea	59
4.3.2	Migración y quimioquinas responsables	59
4.4	Respuesta inmune durante la infección bacteriana	61
5.	Nuevas terapias para tratar las infecciones por BGN	62
5.1	Antiguos antibióticos	64
5.2	Terapia de fagos	65
5.3	Inhibidores de factores de virulencia	65
5.3.1	Inhibidores de la adherencia bacteriana	66
5.3.2	Inhibidores del <i>quorum sensing</i>	66
5.3.3	Inhibidores de los sistemas de secreción	67

ÍNDICE DE CONTENIDOS

5.3.4	Inhibidores de toxinas	67
5.4	Moléculas con acción frente al sistema inmune	68
5.4.1	Moléculas moduladoras de la respuesta inmune	68
5.4.2	Péptidos antimicrobianos	68
5.5	Anticuerpos y vacunas	69
5.6	Reposicionamiento de fármacos	69
5.6.1	Artículo 1. <i>Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections</i>	72
II. FUNDAMENTOS		85
III. HIPÓTESIS		87
IV. OBJETIVOS		89
V. RESULTADOS		92
1. Capítulo I. Reposicionamiento del tamoxifeno como estrategia antimicrobiana		93
1.1	Artículo 2. <i>Tamoxifen repurposing to combat infections by multidrug-resistant Gram-negative bacilli</i>	94
2. Capítulo II. Reposicionamiento de la rafoxanida como tratamiento antimicrobiano		132
2.1	Artículo 3. <i>Repositioning rafoxanide to treat Gram-negative bacilli infections</i>	133
VI. DISCUSIÓN GENERAL		161
VII. CONCLUSIONES		176
VIII. BIBLIOGRAFÍA		179

ABREVIACIONES

5-FU: 5-fluorouracilo

AAC: Acetiltransferasas modificadoras de aminoglucósidos

ABC: Familia casete de unión a ATP (bombas de flujo)

AFLP: Identificación de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados

AHL: Lectonas acil-hemolisinas (autoinductores del *quorum sensing*)

AIP: oligopéptidos autoinductores (*quorum sensing*)

AMR: Resistencia antimicrobiana

ANT: Nucleotidiltransferasas modificadoras de aminoglucósidos

APC: Células presentadoras de antígeno

APH: Fosfotransferasas modificadoras de aminoglucósidos

Bap: Proteína asociada a *biofilm* de *A. baumannii*

BGN: Bacilos gramnegativos

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido

BL/IBL: Beta-lactámicos/Inhibidores de beta-lactamasas

CAZ/AVI: Ceftazidima/Avibactam

CC: Complejos clonales

CCR2: Receptor de quimioquina CC2 o MCP-1

CD4: Linfocitos T cooperadores

CD8: Linfocitos T citotóxicos

CDC: Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos

cDC: Célula dendrítica convencional

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMS: Colistimetato de sodio

cMoP: Progenitor común de monocitos

CNF-1: Factor citotóxico necrotizante 1

CX₃CR1: Receptor de la quimioquina CX₃C1

DALY: Años de vida ajustados por discapacidad

DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño

DC: Célula dendrítica

DDD: Dosis diarias definidas

DMT: Familia de transporte de metabolitos (bombas de flujo)

EARS-Net: Red Europea de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana

ECAD: *Escherichia coli* de adherencia difusa

ECDC: Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades

ABREVIACIONES

- ECEA:** *Escherichia coli* enteroagregativa
- ECEH:** *Escherichia coli* enterohemorrágica
- ECEI:** *Escherichia coli* enteroinvasiva
- ECEP:** *Escherichia coli* enteropatógena
- ECET:** *Escherichia coli* enterotoxigénica
- EE.UU.:** Estados Unidos
- ERK:** Proteína quinasa activada por mitógenos
- ESAC-Net:** Red Europea de Vigilancia para el Consumo de Antimicrobianos
- ESKAPE:** Grupo de bacterias conformado por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.
- ExPEC:** *Escherichia coli* extraintestinal
- FDA:** Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos
- G-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos
- HlyA:** Alfa-hemolisina de *Escherichia coli*
- HSC:** Célula madre hematopoiética
- IAAs:** Infecciones asociadas a la atención sanitaria
- IC:** Clones internacionales
- iDC:** Célula dendrítica inflamatoria
- IL:** Interleuquina
- INF:** Interferón
- iNOS:** Enzima óxido nítrico inducible
- ITU:** Infecciones del tracto urinario
- KC:** Quimioatrayente de queratinocitos
- KO:** *knock out*
- L-Ara4N:** 4-amino-4-deoxi-l-arabinosa
- Lpp:** Lipoproteína de Braun
- LppA:** Lipoproteína mureina
- LPC:** Lisofosfatidilcolina
- LPS:** Lipopolisacárido
- MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos
- MATE:** Familia de extrusión de fármacos y compuestos tóxicos (bombas de flujo)
- MBL:** Metalobetalactamasa
- MCP-1:** Proteína quimioatrayente de monocitos

ABREVIACIONES

- MDP:** Precursor de macrófagos y células dendríticas
- MDR:** Cepas multirresistentes
- MFS:** Superfamilia mayor de facilitadores (bombas de flujo)
- MHC I-II:** Complejo mayor de histocompatibilidad I-II
- MIP-1:** Proteína inflamatoria de los macrófagos tipo 1
- MLST:** Tipificación multilocus de secuencias
- moDC:** Célula dendrítica derivada de monocitos
- NAVM:** Neumonía asociada a ventilación mecánica
- NETs:** Trampas extracelulares de neutrófilos
- NF- κ B:** Factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
- NLRP3:** Proteína 3 que contiene los dominios NOD LRR y pirina
- NO:** Óxido nítrico
- NOS:** Especies reactivas de nitrógeno
- OMPs:** Proteínas de la membrana externa
- OMS:** Organización mundial de la salud
- OMVs:** Vesículas de membrana externa
- Pal:** Lipoproteína asociada al peptidoglicano
- PAMP:** Patrones moleculares asociados a patógenos
- PBP:** Proteínas de unión a la penicilina
- PD-1:** Molécula de muerte programada 1
- pDC:** Célula dendrítica plasmocitoide
- PDR:** Cepas panresistentes
- PEtN:** Fosfoetanolamina
- PFGE:** Electroforesis en campo pulsado
- PG:** Peptidoglicano
- PIRASOA:** Programa integral de prevención y control de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria y uso apropiado de antimicrobianos
- PKC:** Proteína quinasa C
- PK/PD:** Farmacocinética/Farmacodinamia
- PLA, B, C:** Fosfolipasas A, B, C
- PlcHR:** Fosfolipasa C hemolítica
- PQS:** Sistema señal de quinolonas

ABREVIACIONES

PRIOAM: Programa Institucional para la Optimización del Tratamiento Antimicrobiano

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones

PYO: Cocktail de fagos llamado Pyophage

RND: Superfamilia de resistencia-nodulación-división (bombas de flujo)

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SENIC: Estudio para la Eficacia del Control de la Infección Nosocomial realizado en Estados Unidos

SERM: Moduladores del receptor de estrógenos

SMR: Familia de baja resistencia a fármacos (bombas de flujo)

ST: Secuencia tipo

Stx: Toxina shiga

T1SS: Sistema de secreción tipo I

T2SS: Sistema de secreción tipo II

T3SS: Sistema de secreción tipo III

T4SS: Sistema de secreción tipo IV

T5SS: Sistema de secreción tipo V

T6SS: Sistema de secreción tipo VI

TipDC: Célula dendrítica productora de factor de necrosis tumoral α y enzima óxido nítrico inducible

TLR: Receptores tipo *toll*

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UE/AEE: Unión Europea/Área Económica Europea

Usp: Toxina uropatogénica específica

WT: *Wild type*, silvestre

XDR: Cepas extremadamente resistentes

FIGURAS & TABLAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Infecciones causadas por bacterias multirresistentes medidas en número de casos, muertes atribuidas y años de vida ajustados por discapacidad en UE/AEE en 2015.

Figura 2. Cronología de desarrollo de nuevos antimicrobianos y la evolución de resistencias.

Figura 3. Cambios en el consumo de antimicrobianos medido en DDD por 1000 habitantes por día entre 2000-2015 en un total de 76 países. DDD: Dosis diarias definidas.

Figura 4. Consumo de antibióticos sistémicos expresado en DDD por 1000 habitantes por día en Europa el año 2018. DDD: Dosis diarias definidas.

Figura 5. Estimación del número de muertes a causa de organismos multirresistentes en el año 2020.

Figura 6. Distribución mundial y europea de los clones más frecuentes de *Pseudomonas aeruginosa* MDR/XDR. MDR: cepas multirresistentes, XDR: cepas extremadamente resistentes.

Figura 7. Mecanismos de resistencia intrínsecos, adquiridos y adaptativos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 8. Estructura de las bacterias gramnegativas.

Figura 9. Motilidad bacteriana.

Figura 10. Formación de *biofilm*.

Figura 11. Inmunidad innata y adaptativa.

Figura 12. Fases de la respuesta adaptativa.

Figura 13. Clases de células dendríticas.

Figura 14. Tráfico de monocitos.

Figura 15. Fases de descubrimiento de un fármaco.

Figura 16. Estudios preclínicos destinados al desarrollo de fármacos.

Figura 17. Representación esquemática de los procesos regulatorios a los que están sujetos los compuestos tradicionales versus los compuestos reposicionados.

FIGURAS & TABLAS

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Linajes clonales de *Acinetobacter baumannii* según distintos métodos de genotipado.

Tabla 2. β -lactamasas encontradas en *Acinetobacter baumannii*.

Tabla 3. β -lactamasas encontradas en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.

Tabla 4. Principales factores de virulencia de *Acinetobacter baumannii* y su implicación en la patogénesis.

Tabla 5. Principales factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* y su implicación en la patogénesis.

Tabla 6. Principales factores de virulencia de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y su implicación en la patogénesis.

Tabla 7. Marcadores de las células de la inmunidad innata.

RESUMEN

RESUMEN

El aumento de bacterias multirresistentes y la dificultad de encontrar un tratamiento eficaz para este tipo de infecciones, supone un problema a nivel mundial. Entre los patógenos más destacados se encuentran los bacilos gramnegativos (BGN), tales como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacteriales* como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, para los cuales la investigación y el desarrollo de nuevos antimicrobianos es una prioridad crítica. Debido a que el desarrollo de nuevos antibióticos supone un elevado coste económico, de tiempo empleado y poca rentabilidad a causa de la rápida aparición de resistencias, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas se encuentra en auge. Esta Tesis Doctoral está basada en el uso de un nuevo enfoque conocido como “*Drug repurposing*” o reposicionamiento de fármacos, que consiste en la búsqueda de nuevas indicaciones para fármacos que se usan en la práctica clínica y en veterinaria. El objetivo principal fue el estudio de dos fármacos distintos: i) el tamoxifeno, anticancerígeno usado para el tratamiento de cáncer de mama y ii) la rafoxanida, antihelmíntico usado en veterinaria para tratar infecciones por trematodos. Por un lado, se demostró que la monoterapia con tamoxifeno presentó eficacia *in vivo* en un modelo de sepsis peritoneal murino por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* usando ratones inmunocompetentes e inmunodeprimidos. Esta actividad es debida a la reducción de la liberación de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1, del inglés *monocyte chemoattractant protein-1*), que en última instancia produjo una disminución de la migración de células de la inmunidad innata desde la médula ósea hasta el torrente sanguíneo, reduciendo la inflamación exacerbada producida en este modelo. Además, la modificación de la respuesta inmune del huésped va unida a la actividad antimicrobiana que presentaron los metabolitos del tamoxifeno: n-desmetiltamoxifeno, endoxifeno y 4-hidroxitamoxifeno, frente a las cepas bacterianas de estudio. Por otra parte, se demostró que la rafoxanida potenció el efecto de la colistina en cepas sensibles y resistentes a colistina de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. La sinergia observada es debida posiblemente al aumento de la permeabilidad de membrana y al aumento de cargas negativas en la superficie de la misma, potenciando la afinidad de la colistina y restaurando su actividad. Además, la rafoxanida también presentó eficacia terapéutica tanto en monoterapia como en terapia combinada con colistina en un modelo de sepsis peritoneal murino causado por cepas resistentes a colistina de los tres patógenos. En conjunto, estos resultados proporcionan nuevos conocimientos sobre el uso del anticancerígeno tamoxifeno y el antihelmíntico rafoxanida en monoterapia o en

RESUMEN

combinación con colistina, así como sobre el mecanismo de acción de ambos fármacos. Por ello, esta Tesis Doctoral proporciona dos nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por BGN multirresistentes.

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Situación actual de la resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana se ha convertido en un desafío mundial debido a la alta morbilidad y mortalidad causada por bacterias que presentan resistencia a la gran mayoría de antimicrobianos disponibles en el mercado (1). La Organización Mundial de la Salud (OMS), y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, del inglés *Centers for Diseases Control and Prevention*) ya han declarado la resistencia antimicrobiana como un problema de carácter global. Tan sólo en los EE.UU., se registran más de 2,8 millones de infecciones por bacterias multirresistentes y más de 35.000 muertes al año (2). En los países pertenecientes a la región UE/AEE (para Unión Europea/Área Económica Europea) se producen más de 670.000 infecciones causadas por bacterias multirresistentes y alrededor de 33.000 muertes como consecuencia directa de este tipo de infecciones (3). A nivel mundial, el número de muertes asciende a 700.000, según datos aportados por la OMS (4). Esto es debido al número creciente de bacterias multirresistentes que producen infecciones graves y que anteriormente eran fácilmente tratables, así como la rápida expansión de las mismas a lo largo del globo (4,5). Entre las enfermedades más frecuentes, encontramos la neumonía comunitaria y nosocomial, infecciones del tracto urinario, cistitis, bacteriemias e infecciones adquiridas en el ámbito hospitalario como infecciones relacionadas con cateterismos o post-quirúrgicas (6,7).

Datos del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC; para *European Center for Disease Prevention and Control*) recogidos por la Red Europea de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana (EARS-Net para *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) muestran un aumento de casos y muertes causadas por microorganismos multirresistentes en Europa en los últimos años (Figura 1) (3). Según EARS-Net los porcentajes de resistencia antimicrobiana varían en función del microorganismo, de la región geográfica y del antimicrobiano, hecho que refleja diferencias en la práctica del uso de los antibióticos dependiendo del país (8). En especial, la situación de los BGN es realmente preocupante. Actualmente, alrededor de la mitad (56,4%) de los aislados de *Acinetobacter* spp. informados a EARS-Net en 2018 por parte de los países pertenecientes a la UE/AEE, fueron resistentes a, al menos, una de las familias de antimicrobianos bajo vigilancia regular (fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenémicos). En el caso de *P. aeruginosa*, el porcentaje de aislados resistentes a, al menos, uno de los grupos de antimicrobianos bajo vigilancia regular (piperacilina/tazobactam, fluoroquinolonas, ceftazidima, aminoglucósidos y

INTRODUCCIÓN

carbapenémicos) fue del 32,1%. En cuanto al orden *Enterobacterales*, EARS-Net 2018 informó que más de la mitad de los aislados de *E. coli* (58,3%) y más de un tercio de los aislados de *K. pneumoniae* (37,2%) fueron resistentes a, al menos, uno de los grupos bajo vigilancia regular (aminopenicilinas, fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y carbapenémicos) (9).

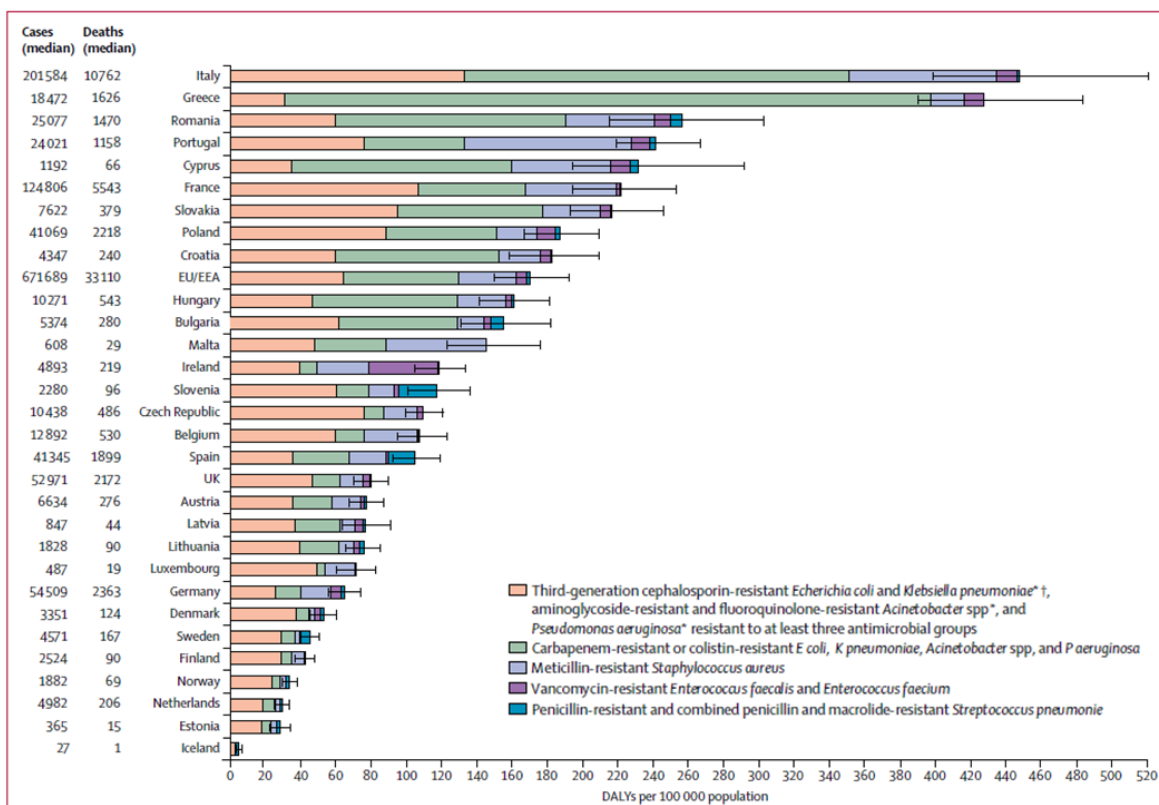


Figura 1. Infecciones causadas por bacterias multirresistentes medidas en número de casos, muertes atribuidas y años de vida ajustados por discapacidad (DALY del inglés *Disability adjusted life years*) en UE/AEE en 2015 (3).

Esta situación ha conllevado a que las opciones terapéuticas para los pacientes infectados por BGN multirresistentes se limite a antibióticos de última línea, y además, se ha unido el hecho de que en los últimos 40 años no se han diseñado nuevas familias de antimicrobianos (Figura 2). Por esta razón, en el año 2017, la OMS publicó una lista de los patógenos para los cuales la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos es una necesidad urgente (10). Dentro de los patógenos considerados como primera prioridad, se encuentran *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, *P. aeruginosa*

INTRODUCCIÓN

resistente a carbapenémicos y enterobacterias resistentes a carbapenémicos y productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).



Figura 2. Cronología de desarrollo de nuevos antimicrobianos y la evolución de resistencias. Imagen extraída de www.biomerieux.com. Challenges. Lack of new antibiotics.

El mal uso de los antimicrobianos durante décadas, tanto en seres humanos como en ganadería, ha sido una de las principales causas de selección y propagación de resistencias. En un estudio en el cual fueron escogidos 76 países distribuidos a lo largo del globo, el consumo de antimicrobianos aumentó de 11,3 a 15,7 dosis diarias definidas (DDD) por 1000 habitantes por día entre 2000 y 2015, hecho que supone un

INTRODUCCIÓN

incremento del 39% (Figura 3) (11). Según datos aportados en el informe epidemiológico anual de 2018, publicado por el ECDC, el consumo de antibióticos sistémicos (incluyendo infecciones comunitarias y nosocomiales) fue de 20,1 DDD por 1000 habitantes por día, presentando un rango entre países desde un 9,7-34 DDD por 1000 habitantes por día (12) (Figura 4). Durante el periodo comprendido entre 2009 y 2018, no se encontraron diferencias significativas en el consumo de antimicrobianos teniendo en cuenta todos los países integrantes de la UE/AEE. Sin embargo, se ha visto que la tendencia al consumo ha disminuido en 11 de los países y ha incrementado en 4 de ellos (12).

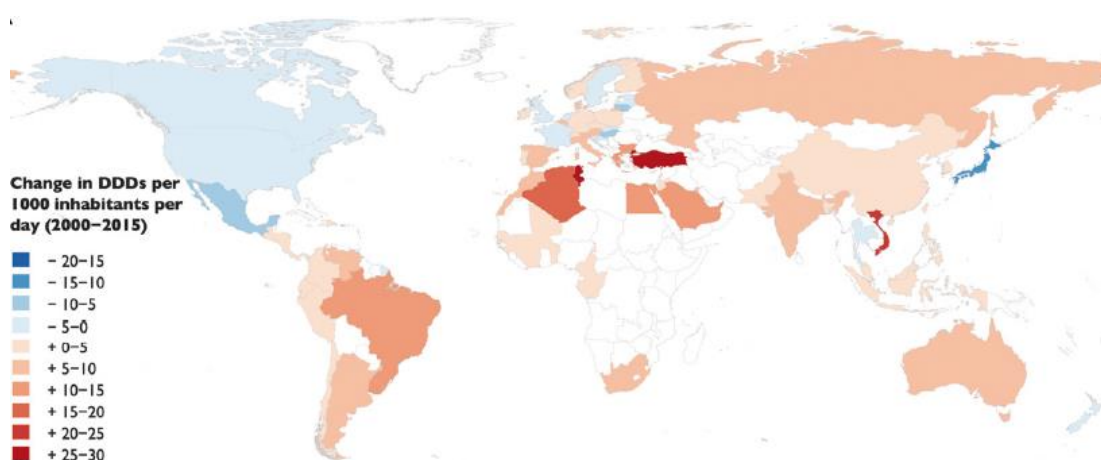


Figura 3. Cambios en el consumo de antimicrobianos medido en DDD por 1000 habitantes por día entre 2000-2015 en un total de 76 países (11).

Consumption of Antibacterials for systemic use (ATC group J01) in the community and hospital sector in Europe, reporting year 2018

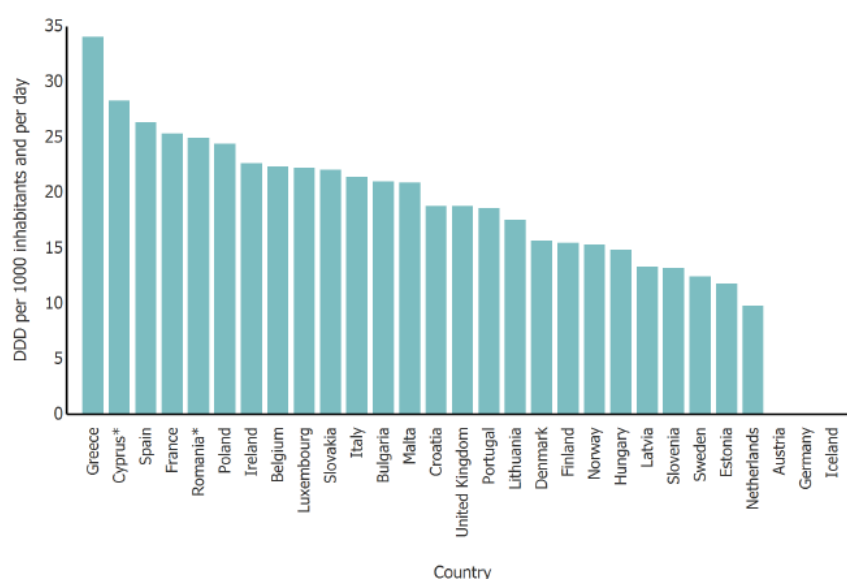


Figura 4. Consumo de antibióticos sistémicos expresado en DDD por 1000 habitantes por día en Europa el año 2018. * Países que sólo han proporcionado datos totales. Gráfica extraída de ESAC-Net (13).

INTRODUCCIÓN

Las penicilinas, son los antibióticos prescritos con más frecuencia en todos los países, mientras que el consumo de otras clases de antimicrobianos como por ejemplo las cefalosporinas, macrólidos, quinolonas o glucopéptidos varió considerablemente entre países y se encuentran en niveles inferiores (12). Además, actualmente se conoce que los países con un mayor consumo de antibióticos presentan mayores tasas de resistencia a los mismos. Si esta situación no revierte, se estima que en 2020, el número de muertes causadas por organismos multirresistentes puede alcanzar los 10 millones al año superando enfermedades como el cáncer (Figura 5) (14).

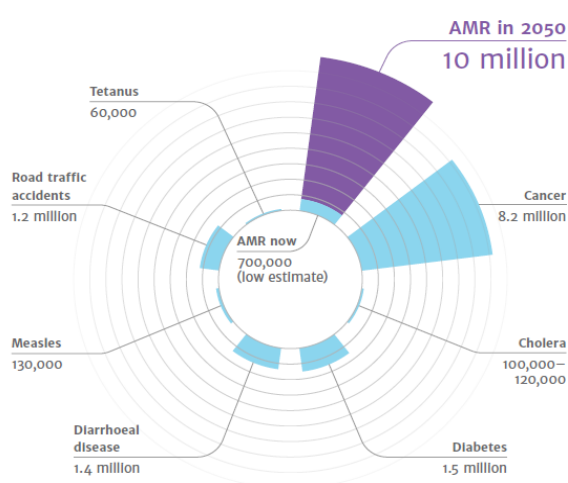


Figura 5. Estimación del número de muertes a causa de organismos multirresistentes en el año 2020 (14) AMR: Antimicrobial resistant.

Debido a la necesidad de reducir el porcentaje de bacterias multirresistentes, la OMS ha puesto en marcha políticas de vigilancia del consumo de antimicrobianos (15). En Europa, ha sido creada una red de vigilancia del consumo de antimicrobianos (ESAC-Net) a nivel de atención primaria y en pacientes hospitalizados para la cual los países integrantes están aportando datos. A nivel nacional, una de las medidas tomadas para reducir el consumo de antimicrobianos y promover el uso adecuado de los mismos es la implementación del programa PIRASOA, un programa integral de prevención y control de infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria y uso apropiado de los antimicrobianos llevado a cabo en Andalucía (España). Transcurridos cuatro años desde su implementación, se ha podido observar una mejora en el uso de antimicrobianos prescritos para tratar infecciones por *E. coli* BLEE de adquisición comunitaria (16). También en Andalucía, en el año 2011 se puso en marcha el programa PRIOAM, con la

INTRODUCCIÓN

finalidad de mejorar la prescripción antibiótica bajo un diseño participativo y de contenido educativo. En este caso, el programa realizado en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla (España), empezó con un 53% de prescripciones inapropiadas y estas han disminuido hasta el 26,4%. Asimismo, el consumo se redujo desde 1150 DDD por 1000 camas ocupadas hasta 852 DDD por 1000 camas ocupadas (17).

Por lo tanto, los altos niveles de resistencia antimicrobiana alcanzados por los BGN en todo el mundo y su tendencia al aumento, especialmente en infecciones relacionadas con el ámbito hospitalario, implican la necesidad de crear estrategias integradas a todos los sectores que engloban la salud (7).

2. Infecciones asociadas a la atención sanitaria (IAAs)

Las infecciones asociadas a la atención sanitaria o infecciones nosocomiales son aquellas que aparecen durante la hospitalización, se manifiestan a partir de las 72 h o más después del ingreso del paciente, y no estaban presentes ni en periodo de incubación antes de la admisión del mismo (18). Estas infecciones constituyen una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados (19). Datos obtenidos en el año 2013, indican que se produjeron alrededor de 4,2 millones de infecciones nosocomiales en la Unión Europea dando lugar a 175.000 muertes (7). Actualmente, se estima que en Europa se producen 8,8 millones de IAAs al año, valores obtenidos teniendo en cuenta hospitales y centros de cuidado a largo plazo (20). En EE.UU., 1,7 millones de pacientes al año adquieren una IAA causando 99.000 muertes (21). Las IAAs se asocian mayormente a los dispositivos invasivos y a cirugías. Entre ellas destacan las infecciones del torrente sanguíneo o bacteriemias, infecciones del tracto urinario (ITU) asociadas a catéter, neumonías asociadas a ventilación mecánica (NAVM) e infecciones del sitio quirúrgico (22). Muchas de estas infecciones están causadas por patógenos multirresistentes incluyendo *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus* resistente a vancomicina (23). Las IAAs, constituyen un grave problema sobretodos para pacientes que se encuentran en las unidades de cuidados intensivos (UCIs). Según datos del ECDC en el año 2017, 11.787 pacientes ingresados en la UCI (8,3%) desarrollaron al menos una IAA que se encuentra bajo vigilancia (bacteriemia, neumonía o ITU). Los patógenos asociados con más frecuencia fueron estafilococos coagulasa negativos (bacteriemia), *P. aeruginosa* (neumonía) y *E. coli* (ITU) (24). Además, recientemente,

INTRODUCCIÓN

se han publicado datos recogidos durante 2008-2012 en los cuales se estima que las IAAs en UCIs suponen 8.650 muertes atribuidas y 3,43 millones de días extras de hospitalización al año (25). Como resultado de estas infecciones, se produce un aumento del tiempo de hospitalización, de la mortalidad y en última instancia de los costes económicos en relación a la salud pública (26). Se ha calculado que los costes asociados a este tipo de infecciones oscilan entre los 5 y 10 billones de dólares anuales (27).

Una estrategia para reducir las IAAs, es la implantación de protocolos de vigilancia y de respuesta adecuada (28). En los años 80, se demostró la importancia de la vigilancia mediante el Estudio para la Eficacia del Control de la Infección Nosocomial (SENIC) en EE.UU., en el cual se incluyeron 338 hospitales seleccionados al azar estratificados por geografía, capacidad de camas y estado de enseñanza. Los resultados de este estudio mostraron que los programas de control de infecciones realizados por epidemiólogos y los programas de vigilancia redujeron las infecciones nosocomiales un 32% en comparación con aquellos centros que carecían de estos programas (29). Siguiendo la misma estrategia, actualmente en Andalucía el programa PIRASOA no sólo tiene como objetivo promover el uso adecuado de antimicrobianos sino también reducir la tasa IAAs hasta alcanzar niveles de excelencia.

Es importante destacar que las infecciones nosocomiales causadas por bacterias gramnegativas preocupan especialmente debido a la capacidad de estos patógenos para inducir o adquirir genes de resistencia. En EE.UU. alrededor de un 70% de las infecciones en UCIs están causadas por patógenos gramnegativos (30). Particularmente, los BGN requieren de especial atención debido a que son una causa frecuente de IAA y además las tasas de resistencia en estas bacterias está aumentando (27).

3. Bacilos gramnegativos (BGN): Epidemiología, resistencia antimicrobiana, opciones terapéuticas y virulencia

El auge de las infecciones causadas por BGN multirresistentes representa un desafío a nivel global, sobre todo cuando nos referimos al tratamiento de infecciones adquiridas a nivel hospitalario. Especialmente en las UCIs, los BGN son los responsables de gran parte de las neumonías de adquisición hospitalaria e ITU, y del 25-30% de infecciones de sitio quirúrgico y del torrente sanguíneo (31). Algunos de los agentes etiológicos con más relevancia a nivel de infecciones nosocomiales, sobre todo en pacientes cuya

INTRODUCCIÓN

atención requiere de ventilación mecánica o catéteres son *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y algunas *Enterobacterales* como *E. coli*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Proteus*. Todos ellos, fueron considerados por la OMS como prioridad crítica para la investigación y el desarrollo de nuevos antimicrobianos debido a las tasas de multirresistencia observadas en los últimos años (10).

3.1 *Acinetobacter baumannii*

El género *Acinetobacter* spp. comprende cocobacilos gramnegativos, aerobios estrictos, catalasa-positivos, oxidasa-negativos y no fermentadores. Este género se encuentra ampliamente distribuido en diferentes ambientes como el agua, suelos, animales o humanos (32). Dentro de las especies de *Acinetobacter*, *A. baumannii* es el miembro más importante debido a su asociación con infecciones nosocomiales y a su alta capacidad de desarrollar resistencia a diversas familias de antimicrobianos (33). Además, aunque no se considere un patógeno de adquisición comunitaria, su incidencia en la comunidad está aumentando en regiones con climas calurosos y húmedos (34).

3.1.1 Epidemiología

A. baumannii es un importante agente causal de infecciones nosocomiales, representando hasta el 20% de las infecciones adquiridas en UCI en todo el mundo (35,36). Su importancia clínica radica en que es la causa de aproximadamente el 12% de las bacteriemias en las UCIs (37), una causa común de NAVM y causante de infecciones en herida quirúrgica u otro tipo de heridas (38). Además, los pacientes quemados son susceptibles a desarrollar una infección por *A. baumannii*, considerándose población de riesgo.

Según datos aportados por el ECDC, *Acinetobacter* spp. fue la undécima causa de infección asociada al ámbito hospitalario, equivalente al 3,6% (39). Dentro de este tipo de infecciones, el 8,7%, 4,1% y 2,9% fueron neumonía, bacteriemia e infección del sitio quirúrgico, respectivamente (39). En Asia, la prevalencia de *A. baumannii* es más elevada siendo la mayor causa de neumonía de adquisición hospitalaria en China y Tailandia y de NAVM en ambos países además de en Malasia y Taiwán, rondando valores entre el 16-50% (40). Datos recogidos en India durante 2012-2016, mostraron que el 42,9% de los aislados de IAAs fueron *Acinetobacter* spp. Sin embargo, el dato

INTRODUCCIÓN

más alarmante es que el 88% y el 61% fueron multirresistentes y panresistentes, respectivamente (41). En Europa, el 56,4% de los aislados de *Acinetobacter* spp. fueron resistentes a, al menos, un grupo de los siguientes antimicrobianos: fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenémicos, y el 28,8% presentó resistencia combinada a todos ellos (9). En cuanto a la resistencia a colistina, el 4% de los aislados testados fueron resistentes, encontrándose mayoritariamente en Grecia e Italia. Sin embargo, estos datos no son del todo representativos debido al bajo número de aislados testados (42). Estudios realizados en regiones del continente asiático como China e India, muestran mayor porcentaje de IAAs causadas por *Acinetobacter* spp. con porcentajes de resistencia del 67% o superiores (41). Finalmente, como se ha mencionado anteriormente, *A. baumannii* raramente causa infecciones adquiridas en la comunidad a no ser que se trate de pacientes con enfermedades subyacentes. Este tipo de infecciones están más asociadas a zonas con climas cálidos y húmedos, siendo Hong Kong, Singapur y Taiwán donde se han encontrado un mayor número de casos (34).

Para clasificar las diferentes cepas de *A. baumannii* en linajes clonales, se realizan varios métodos de genotipado. Entre los más comunes se encuentra la electroforesis en campo pulsado (PFGE del inglés *pulsed-field gel electrophoresis*), la tipificación multilocus de secuencias (MLST del inglés *multilocus sequence typing*) o la identificación de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP del inglés *amplified fragment length polymorphism*), entre otras. El MLST es una técnica genética que consiste en la secuenciación de fragmentos de ADN internos (habitualmente 7) de genes de mantenimiento o en inglés “*housekeeping genes*” (genes conservados necesarios para el mantenimiento del patógeno). A cada secuencia única que se encuentra en un gen de mantenimiento se le asigna un número particular de alelo, de manera que cada aislado se caracterizará por las secuencias únicas de alelos en cada uno de los 7 genes. Esto permitirá separar los aislados en grupos con idénticos perfiles alélicos o secuenciotipos (ST) y en complejos clonales (CCs) (43).

En *A. baumannii* existen dos esquemas de MLST disponibles pertenecientes a dos bases de datos distintas. Por un lado encontramos la base de datos PubMLST, que asigna 287 ST diferentes que se pueden agrupar en 21 CC. Por otra parte, se encuentra MLST de Pasteur, que asigna las cepas en 176 ST distintos y 20 CC. Además, existen los conocidos linajes clonales internacionales (IC), identificados previamente por AFLP, representados en los dos esquemas (44). A diferencia de otros patógenos como *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, para los cuales se utiliza la nomenclatura de

INTRODUCCIÓN

secuencia tipo (ST) obtenidas por MLST, en *A. baumannii* sigue siendo más frecuente el uso de los IC (45). Existen 7 grupos distintos descritos por AFLP: IC1, IC2, IC3, Clúster A, Clúster B, Clúster C y Clúster 6 (44,45). Tres de ellos, IC1-3 son los más predominantes en Europa y se han diseminado por todo el mundo, de aquí la nomenclatura de clones internacionales (39,45). La mayoría de los brotes en Europa se han relacionado con estos tres clones, sin embargo IC-2 es el más prevalente. En cuanto a la resistencia antimicrobiana, cepas multirresistentes (MDR) y panresistentes (PDR) también se han asociado con estos clones (39). Varios estudios muestran que, en España, los clones más frecuentes son el IC-II o ST-2, IC-III o ST-3 principalmente, seguidos de otros más minoritarios como ST-15, ST-80 o ST-79 (46,47).

Tabla 1. Linajes clonales de *Acinetobacter baumannii* según distintos métodos de genotipado. Tabla adaptada de Zarrilli R *et al.* 2013 (44).

AFLP	Pasteur's MLST	PubMLST
IC I	CC1	CC109
IC II	CC2	CC92
IC III	CC3 ST25	CC110
Clúster A	CC15 ST78	CC103
Clúster B	CC10	
Clúster 6	CC32	
Clúster C	ST52 CC79	CC113

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*, MLST: *Multilocus Sequence Typing*

3.1.2 Mecanismos de resistencia antimicrobiana

A. baumannii ha sido uno de los patógenos más exitosos en cuanto a la adquisición de resistencias. Se encuentra dentro de los patógenos denominados ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y distintas especies de *Enterobacter*), los cuales presentan una alta capacidad de evadirse de la acción bactericida de muchos antimicrobianos presentando altas tasas de multirresistencia junto con una elevada virulencia (48). Se conocen varios mecanismos de resistencia para *A. baumannii*, incluyendo la degradación o modificación enzimática

INTRODUCCIÓN

de antibióticos (mediada por enzimas β -lactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos), bombas de flujo, cambios en la permeabilidad o modificación de la diana (35).

3.1.2.1. Enzimas β -lactamasas

La inactivación de los antibióticos β -lactámicos es uno de los principales mecanismos de resistencia de *A. baumannii*. Las β -lactamasas se agrupan en 4 clases moleculares en base a la homología de su secuencia: A, B, C y D (Tabla 2) (35,49). Todas ellas están presentes en *A. baumannii* posiblemente debido a la capacidad de este patógeno de incorporar ADN exógeno mediante transferencia horizontal (50). En *A. baumannii* existen β -lactamasas de clase A de espectro reducido como TEM-1 o SCO-1, así como BLEEs incluyendo TEM-92, GES-14 o CTX-M-2. Dentro de la clase C, *A. baumannii* presenta de manera intrínseca AmpC responsable de la hidrolización de cefalosporinas. Por último, en *A. baumannii* se encuentran más de 400 tipos de enzimas de clase D, llamadas enzimas tipo OXA, siendo OXA-23 una de las más frecuentes y más distribuida (35).

Tabla 2. β - lactamasas encontradas en *Acinetobacter baumannii*.

Clase	Descripción	Ejemplos
Clase A	β -lactamasas dependientes de serina. Hidrolizan penicilinas y cefalosporinas. Son inhibidas por clavulanato.	TEM, SHV, GES, CTX-M, SCO, PER y VEB
Clase B	Metalo- β -lactamasas (MBL) que requieren metales pesados para la catálisis. Hidrolizan todos los β -lactámicos, incluyendo carbapenémicos pero no monobactámicos.	KPC y CRAB
Clase C	β -lactamasas dependientes de serina. Confieren resistencia a las cefamicinas, penicilinas y cefalosporinas.	AmpC
Clase D	β -lactamasas dependientes de serina. Comúnmente conocidas como oxacilinasas. Hidrolizan la oxacilina de manera preferente.	Subgrupos: OXA-2, OXA-6, OXA-10, OXA-20, OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, OXA-143 y OXA-235

INTRODUCCIÓN

3.1.2.2. *Enzimas modificadoras de aminoglucósidos*

Principal mecanismo por el cual *A. baumannii* adquiere resistencia a aminoglucósidos. Este grupo de enzimas se clasifican en acetiltransferasas como AAC(6'), adeniltransferasas como ANT(3'') y fosfotransferasas como APH(3') (51). Además, se ha descrito que cepas multirresistentes de *A. baumannii* son capaces de producir una combinación de estas enzimas (52).

3.1.2.3. *Bombas de flujo*

Las bombas de flujo son un mecanismo por el cual se regula el paso de distintas sustancias incluidos los antibióticos. Se han descrito seis tipos de familias (53), cinco de ellas identificadas en *A. baumannii* (54):

- **Superfamilia de resistencia-nodulación-división (RND**, del inglés *Resistance-nodulation-division*): Expulsan el antimicrobiano usando la fuerza protón motriz (53). En *A. baumannii* se encuentra AdeABC, responsable de la resistencia a aminoglucósidos además de presentar una amplia variedad de sustratos como tigeciclina, tetraciclina, β -lactámicos, cloranfenicol, macrólidos y fluoroquinolonas (54,55).
- **Superfamilia mayor de facilitadores (MFS**, del inglés *Major facilitator superfamily*): Transportan un amplio abanico de sustratos a través de las membranas y están implicadas en muchos procesos biológicos (56). Normalmente no son transportadores de fármacos, pero pueden actuar como transportadores específicos para ciertas clases de antimicrobianos. En *A. baumannii* se encuentra Tet(A) que confiere resistencia a tetraciclina y Tet (B) implicada en la resistencia a tetraciclina y minociclina (57).
- **Familia de extrusión de fármacos y compuestos tóxicos (MATE**, del inglés *Multidrug and toxic compound extrusion*): Utiliza la fuerza protón motriz para expulsar el antimicrobiano. Familia a la que pertenece AbeM, bomba que produce un aumento en la concentración mínima inhibitoria (CMI) de quinolonas y aminoglucósidos (58).

INTRODUCCIÓN

- **Familia de baja resistencia a fármacos (SMR**, del inglés *Small multidrug resistance*): Incluye AbeS, bomba de flujo que produce un aumento en la CMI de eritromicina y novobiocina (59).
- **Familia casete de unión a ATP (ABC**, del inglés *ATP binding cassette*): Median la importación y la exportación de solutos de manera ATP-dependiente. Raramente se encuentran en bacterias gramnegativas (54). En *A. baumannii* se ha demostrado su implicación en la virulencia (60).
- **Familia de transporte de metabolitos (DMT**, del inglés *Drug metabolite transporter*): Se ha asociado un gen de esta familia a una cepa multirresistente de *A. baumannii* usando un análisis genómico comparativo (61) pero no suelen estar presentes en *A. baumannii*.

3.1.2.4. Defectos en la permeabilidad

Los cambios en la permeabilidad de membrana son debidos a la modificación de proteínas de la membrana externa como las porinas, canales encargados de transportar sustancias a través de dicha estructura, o bien por cambios en otros componentes como el lipopolisacárido (LPS) y los peptidoglicanos. El aumento o la disminución de la expresión de porinas modifican notoriamente la permeabilidad de membrana y juega un papel importante en la aparición de mecanismos de resistencia. La reducción de la expresión de CarO (62), la proteína homóloga de OprD (63), Omp22 (64), Omp33-36 (65), entre otras, está relacionada con la resistencia a carbapenémicos. Además, nuestro grupo de investigación describió por la primera vez que Omp25 está implicada en la resistencia a colistina (66), y OmpA en la resistencia a aztreonam, cloranfenicol y ácido nalidíxico (67).

3.1.2.5. Modificación de la diana

En *A. baumannii* se han detectado modificaciones en la diana de distintos antibióticos. En el caso de la resistencia a quinolonas, se han descrito modificaciones en GyrA (subunidad de la ADN girasa) y ParC (subunidad de la topoisomerasa IV) (68,69). En cuanto a la tetraciclina y la tigeciclina, se han detectado mutaciones en TetM y TetX,

INTRODUCCIÓN

respectivamente, que confieren protección ribosomal (70,71). Finalmente, también se puede producir una modificación o pérdida del LPS que afecta principalmente a la actividad de la colistina. Se ha descrito la modificación del lípido A (componente del LPS) mediante la adición de fosfoetanolamina (PEtN) debido a mutaciones en el sistema de regulación de dos componentes *pmrA/pmrB* (72). Además, la inactivación *in vitro* de los genes que sintetizan el LPS (*lpxA*, *lpxC* y *lpxD*) resultando en la pérdida completa del mismo, aumentan la resistencia a colistina. Sin embargo, estas modificaciones no han sido descritas en la clínica posiblemente debido al alto coste de *fitness* que suponen (73,74). Por último, la adquisición de plásmidos que contienen el gen *mcr* implicado en la resistencia a colistina también ha sido descrita en *A. baumannii* (75).

3.1.3 Tratamientos actuales

A. baumannii presenta varias alternativas terapéuticas cuando se trata de un aislado sensible. Estas infecciones pueden ser tratadas con cefalosporinas de amplio espectro (como ceftazidima o cefepime), carbapenémicos (como imipenem, meropenem o doripenem) o la combinación de β -lactámicos/inhibidores de β -lactamasas (BL/IBL), siendo ampicilina-sulbactam una de las combinaciones más usadas (76). Sin embargo, el aumento de la resistencia a estos antibióticos ha promovido la necesidad de usar los últimos fármacos que permanecen activos como tigeciclina y sulbactam, o bien usar antiguos antibióticos que habían quedado en desuso como las polimixinas y minociclina.

Polimixinas: La colistina (polimixina E) junto a la polimixina B, son antibióticos bactericidas concentración dependientes. Se diferencian solo en un aminoácido, pero su administración es distinta. La polimixina B se administra de forma directa mientras que la colistina se administra en forma de colistimetato de sodio (CMS, del inglés *colistimethate sodium*), pro-droga que se convertirá en colistina después de la administración (77). El uso de una u otra depende del área geográfica, en Europa se usa CMS (77). Ambos empezaron a comercializarse en los años 50 y posteriormente quedaron en desuso, por ello, el conocimiento de farmacocinética y seguridad es reducido (78).

INTRODUCCIÓN

Tienen como diana el LPS, presentando una actividad potente frente a bacterias gramnegativas. Debido a la elevada resistencia antibiótica que presenta *A. baumannii*, este grupo de fármacos se ha convertido en uno de los últimos recursos (79). Sin embargo, estudios realizados en humanos, muestran que la colistina presenta un perfil farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD, del inglés *pharmacokinetics /pharmacodynamics*) sub-óptimo (80). Además, una de las principales desventajas es la nefrotoxicidad, hecho que reduce la ventana terapéutica del fármaco (81). El aumento del uso de la colistina ha promovido el aumento de resistencias en algunos países, sobre todo en los países asiáticos. En el año 2016, el 4% de los aislados en Europa fueron resistentes (42) y además, se han descrito fenómenos de heterorresistencia relacionados con el fracaso clínico (82). La incapacidad de las polimixinas de alcanzar valores óptimos de PK/PD y la posible selección de resistencias durante el tratamiento, ponen en duda su uso como monoterapia (83). Una posible solución es la combinación con otros antimicrobianos. Varios estudios preclínicos y clínicos indican que la colistina presenta sinergia con sulbactam, rifampicina o carbapenémicos (84-86).

Tigeciclina: Primer antibiótico de una nueva familia de antimicrobianos llamados glicilciclinas. Se trata de un antibiótico bacteriostático debido a su unión con la subunidad 30S del ribosoma. A pesar de que la tigeciclina presenta una excelente actividad *in vitro*, no parece más efectiva que otras terapias utilizadas para *A. baumannii* multirresistente (87,88). La principal razón radica en que las concentraciones alcanzadas en pulmón y sangre después de una dosis estándar, son sub-óptimas (89). La utilización de dosis más altas ha presentado mejores resultados clínicos en pacientes con NAVM (90). No obstante, en este caso es necesario un mayor seguimiento debido a los problemas de toxicidad.

Sulbactam: Inhibidor de β -lactamasas que suele formularse junto con ampicilina para el tratamiento de bacterias con resistencia mediada por estas enzimas. Sin embargo, el sulbactam por sí solo presenta actividad intrínseca frente *A. baumannii*, debido a su afinidad por las proteínas de unión a penicilina (PBP, del inglés *penicillin-binding-protein*) tipo 1A y tipo 2 (91). La mayoría de ensayos clínicos han sido realizados en combinación con ampicilina, presentando mejores resultados que la terapia con colistina (92,93). Lamentablemente, en la última década se ha detectado un aumento mantenido de la resistencia a sulbactam (94).

INTRODUCCIÓN

Minociclina: Antibiótico bacteriostático perteneciente a la familia de las tetraciclinas. Igual que la tigeciclina, se une a la subunidad 30S del ribosoma impidiendo la síntesis proteica. La tasa de susceptibilidad de *A. baumannii* frente a este antibiótico (alrededor del 80%) así como ensayos clínicos realizados hasta la fecha, convierten a este fármaco en un buen candidato (95,96). Sin embargo, más estudios son necesarios para determinar el papel de la minociclina en el tratamiento de infecciones por *A. baumannii* multirresistente.

3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un patógeno gramnegativo, no fermentador, oportunista y muy ubicuo en el medio ambiente. Causa principalmente infecciones nosocomiales como NAVM, bacteriemias e ITU en pacientes inmunodeprimidos con neutropenia, quemaduras y fibrosis quística. Estas infecciones se caracterizan por requerir altos periodos de hospitalización además de altos costes sanitarios (97).

3.2.1 Epidemiología

P. aeruginosa es un patógeno con una alta resistencia intrínseca a los antibióticos debido a la capacidad de su membrana externa de evitar la entrada de estas moléculas así como su expulsión. Datos proporcionados por la ECDC en 2019, informan que en el año 2017 *P. aeruginosa* fue uno de los microorganismos aislados con más frecuencia en la UCI, siendo el primer causante de neumonía y frecuentemente aislado en bacteriemias y UTIs. En España es el primer agente etiológico aislado en neumonías adquiridas en esta unidad (24%) (24). En otros países del mundo como India, China o Etiopía los aislados de *P. aeruginosa* obtenidos en cohortes realizadas con pacientes de UCI fueron el 10,2%, 15,5% y 7,1%, respectivamente (41). En Kuwait los aislados obtenidos de pacientes con quemaduras fueron el 14,6% (98).

En relación a la resistencia antimicrobiana, el porcentaje de resistencia en la UE/AEE en 2018 a piperacilina/tazobactam, fluoroquinolonas, carbapenémicos, ceftazidima y aminoglucósidos fue del 18,3%, 19,7%, 17,2%, 14,1% y 11,8%, respectivamente. Un 32,1% de los aislados fueron resistentes a al menos uno de los antibióticos anteriores y el 4,1% presentaron resistencia a todos ellos. Afortunadamente, la resistencia a tres grupos o más de estos antimicrobianos ha disminuido entre 2015 y 2018 (9). Además, la

INTRODUCCIÓN

resistencia a colistina en Europa presenta niveles bajos siendo inferior al 1% (42). En EE.UU., el CDC informó en 2019 que se produjeron 32.600 casos de *P. aeruginosa* MDR en pacientes hospitalizados en el año 2017, y un total de 2.700 muertes (2). Por último, en los países asiáticos como India y China, el porcentaje de aislados de *P. aeruginosa* MDR en los estudios comentados anteriormente fue de 66,7% y 16,7%, respectivamente.

En cuanto a su distribución, *P. aeruginosa* presenta una estructura epidemiológica no-clonal, clasificada en ST específicos obtenidas mediante MLST. Se ha consensuado que no hay asociación entre un clon y un hábitat en concreto (99), sin embargo, la transmisión en los hospitales ha aumentado la prevalencia de clones específicos (100). Existen tres clones vinculados a cepas MDR y XDR (XDR, del inglés *extensively drug-resistant*) llamados clones de alto riesgo. Estos clones pertenecen al ST111, ST175 y ST235 y están distribuidos en todo el mundo. El clon más diseminado es el ST235, seguido por el ST111 que ha sido aislado en todos los continentes menos en Oceanía. Por último el ST175 que se encuentra distribuido por varios países europeos (Figura 6) (101).



Figura 6. Distribución mundial (A) y europea (B) de los clones más frecuentes de *Pseudomonas aeruginosa* MDR/XDR (101). MDR: *multidrug-resistant*, XDR: *extensively drug-resistant*.

INTRODUCCIÓN

3.2.2 Mecanismos de resistencia antimicrobiana

Los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* se pueden clasificar en intrínsecos, adquiridos o adaptativos (Figura 7).

3.2.2.1. Mecanismos de resistencia intrínsecos

La resistencia intrínseca es aquella que se encuentra codificada en el cromosoma. En el caso de *P. aeruginosa*, consiste principalmente en la baja permeabilidad de la membrana externa, la expresión constitutiva de bombas de flujo y la expresión cromosómica inducible de β -lactamasas.

- **Defectos en la permeabilidad:** Las porinas son la principal causa de la disminución en la permeabilidad. OprF (homóloga de OmpA en *A. baumannii* y *E. coli*) es la porina mayoritaria de *P. aeruginosa* y es la responsable de la entrada inespecífica de iones y sacáridos (102). A diferencia de lo que ocurre en otras bacterias, alrededor del 95% de OprF se encuentra en conformación cerrada, siendo el motivo principal por el cual *P. aeruginosa* presenta una permeabilidad mucho menor que el resto de patógenos (103). La segunda porina más abundante en *P. aeruginosa* es OprD y una de las más estudiadas debido a su implicación en la resistencia a carbapenémicos, sobretodo imipenem y meropenem (104). OprD está altamente regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional por reguladores de bombas de flujo, metales, pequeñas moléculas etc.; por ello, se cree que es el mecanismo de resistencia a carbapenémicos más prevalente (105). Se pueden dar mutaciones que resultan en una disminución de la expresión de OprD, conllevando a la resistencia a imipenem, pero también se han descrito mutaciones que consisten en la sustitución de aminoácidos específicos sin afectar la transcripción (106). Varios estudios funcionales revelan que el truncamiento de la proteína, sobretodo de los *loops* 2 y 3 (loops que permiten la entrada de imipenem), están implicados en la resistencia a este antibiótico (107). Un estudio reciente realizado en pacientes con bacteriemia, revela que las infecciones causadas por aislados de *P. aeruginosa* con OprD truncada presentaron mayor tasa de mortalidad que aquellos infectados con *P. aeruginosa* con OprD intacta (108). Finalmente, OprH está asociada con la resistencia a polimixina B y gentamicina (109,110).

INTRODUCCIÓN

- **Bombas de flujo:** Las bombas de flujo también juegan un papel importante a la hora de expulsar componentes tóxicos, incluyendo antibióticos, fuera de la célula bacteriana. Igual que en el caso de *A. baumannii*, las bombas de flujo de *P. aeruginosa* se clasifican en seis familias: RND, MFS, MATE, SMR, ATP y DMT aunque no todas intervienen en la resistencia antimicrobiana. Clínicamente, las bombas de flujo más relevantes de *P. aeruginosa* son MexAB-OprM, MexXY/OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN, todas ellas pertenecientes a la superfamilia RND. MexAB-OprM y MexXY/OprM presentan una alta prevalencia en cepas clínicas y confieren resistencia a un amplio rango de antibióticos (111). MexCD-OprJ y MexEF-OprN expulsan β -lactámicos y quinolonas, respectivamente (112,113).

- **Enzimas inactivadoras de antibióticos:** La enzima más relevante es AmpC, una β -lactamasa de expresión cromosómica que confiere bajo nivel de resistencia a aminopenicilinas y cefalosporinas. Sin embargo, AmpC puede hiperproducirse a través de mecanismos de resistencia adaptativos o adquiridos y conferir resistencia a un gran número de antibióticos (114). Además, en el cromosoma de *P. aeruginosa* también se pueden encontrar enzimas modificadoras de aminoglucósidos como la APH(3')-IIb (115).

3.2.2.2. Mecanismos de resistencia adquiridos

P. aeruginosa puede adquirir resistencia a antibióticos a través de la mutación de genes intrínsecos o bien por transferencia horizontal mediante plásmidos, transposones e integrones de otras bacterias (116). A diferencia de la resistencia intrínseca, la resistencia adquirida está relacionada con la presión antibiótica dando lugar a la selección de poblaciones resistentes (117). Los genes de resistencia intrínsecos están regulados positivamente o negativamente por mecanismos regulatorios. La mutación de una de estas vías reguladoras puede aumentar la actividad del promotor dando lugar a un aumento de la expresión de estos genes y consecuentemente, una hiperproducción de enzimas y bombas de flujo.

- **Defectos en la permeabilidad:** Se han descrito mutaciones en proteínas de la membrana externa que confieren resistencia a antimicrobianos. La pérdida o reducción de OprD, porina específica de carbapenémicos, reduce la permeabilidad de membrana

INTRODUCCIÓN

confiriendo resistencia a los mismos (118). Además, como se ha comentado anteriormente, mutaciones en aminoácidos de OprD que no afectan a su expresión también pueden producir resistencia a carbapenémicos (106).

- **Bombas de flujo:** Se han descrito variedad de mutaciones en bombas de flujo responsables de la resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa*. Entre ellas, se encuentran las mutaciones en MexAB/OprM y MexXY/OprM, que confieren resistencia a β -lactámicos (119,120).

- **Enzimas inactivadoras de antibióticos:** Como se ha comentado en el apartado de la resistencia intrínseca, un ejemplo sería la inactivación por mutación de ampD (represor de ampC) que conduce a una sobreexpresión de la β -lactamasa y al aumento de la resistencia (121). Otra forma de resistencia adquirida consiste en la transferencia horizontal de genes de resistencia. *P. aeruginosa* ha adquirido β -lactamasas tipo BLEE como TEM (nombre procedente del primer paciente Temoneira) o VEB (Vietnam extended-spectrum- β -lactamase) y metalobetalactamasas (MBL), siendo las más frecuentes VIM (Verona-integron-encoded-metallo- β -lactamase) e IMP (Active on imipenem β -lactamase). Por último, aunque menos común, también se ha descrito la adquisición de carbapenemasas tipo KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) y GES (Guiana extended spectrum β -lactamase (122).

En cuanto a enzimas modificadoras de aminoglucósidos, se ha descrito la presencia en plásmidos o integrones de todos los grupos de enzimas predominando las acetiltransferasas (115).

- **Modificación de la diana:** Otra estrategia bacteriana consiste en la modificación o protección de la diana antimicrobiana. Mutaciones en genes de *P. aeruginosa* que codifican para la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) o la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) reducen la afinidad con la que se unen las quinolonas conduciendo a una mayor susceptibilidad (122). También se han descrito modificaciones en las PBPs aumentando la resistencia a β -lactámicos (123) y mutaciones en los sistemas de regulación PhoPQ y PmrAB, que modifican el lípido A confiriendo una mayor resistencia a polimixinas (124).

INTRODUCCIÓN

3.2.2.3. Mecanismos de resistencia adaptativos

La resistencia adaptativa se trata de un mecanismo inestable y transitorio en respuesta a un estímulo como la presencia de un antibiótico u otro tipo de estrés ambiental, y que revierte con la desaparición del mismo (125). Varios estudios ponen de manifiesto la capacidad de *P. aeruginosa* para adquirir resistencia de manera adaptativa a las polimixinas (126,127). Además, también se podrían considerar mecanismos de resistencia adaptativos la formación de *biofilm* y las células persistentes. En el caso de *P. aeruginosa*, es común la formación de ambas formas en el pulmón de los pacientes con fibrosis quística, hecho que complica el tratamiento antimicrobiano (128).

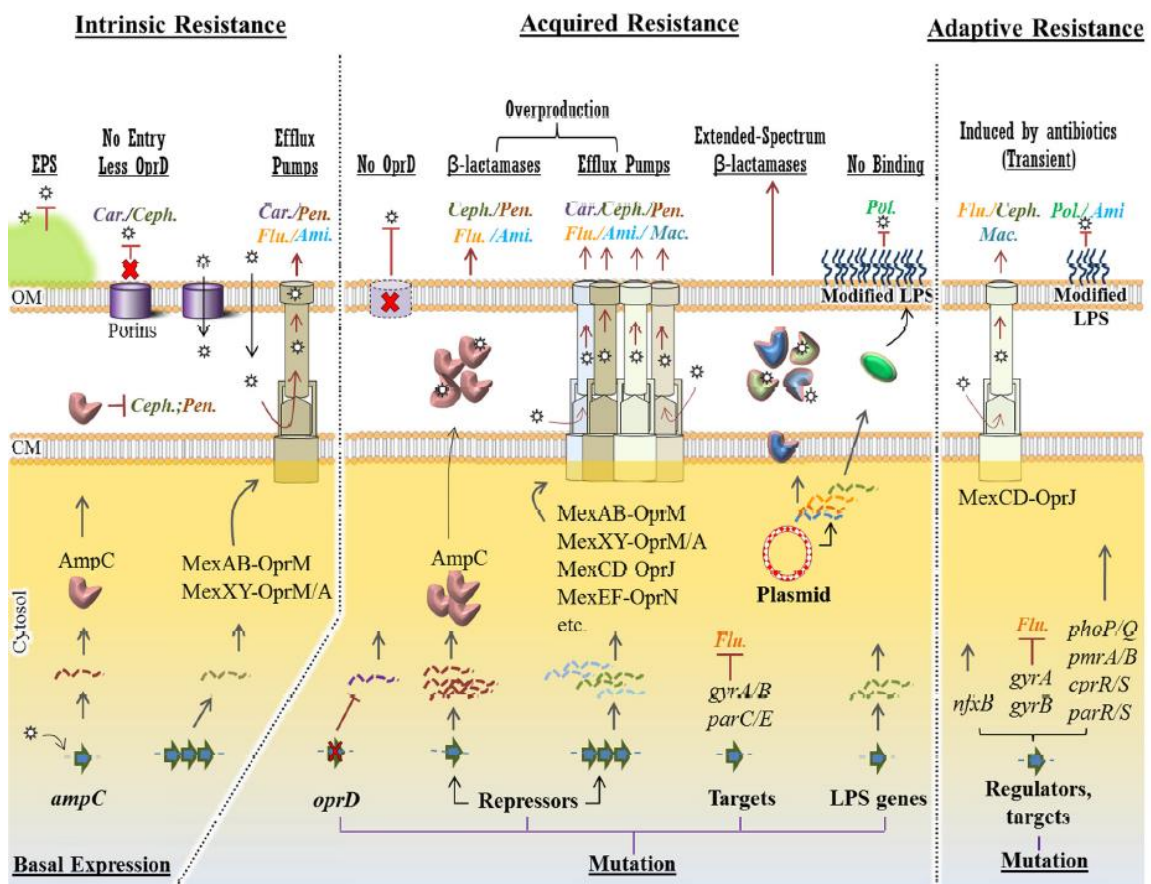


Figura 7. Mecanismos de resistencia intrínsecos, adquiridos y adaptativos de *Pseudomonas aeruginosa*. Car: Carbapenémicos, Ceph: Cefalosporinas, Pen: Penicilinas, Ami: Aminoglucósidos, Flu: Fluoroquinolonas, Mac: Macrólidos, Pol: Polimixinas, CM: Membrana citoplasmática, OM: Membrana externa (129).

INTRODUCCIÓN

3.2.3 Tratamientos actuales

Desde el punto de vista clínico, las infecciones causadas por *P. aeruginosa* se pueden clasificar en agudas-superficiales no invasivas, agudas invasivas o crónicas. Este apartado se centra principalmente en el segundo grupo, que comprende infecciones severas incluyendo bacteriemias, neumonía, endocarditis, infección por quemaduras e infección urinaria, entre otras.

El tratamiento empírico frente a una infección por *P. aeruginosa* se basa en la severidad de la infección. Se tiene en cuenta la presencia de sepsis severa o shock séptico, inmunodepresión severa, infecciones con alto contenido bacteriano no controlable por cirugía y el riesgo de que la infección esté causada por una bacteria multirresistente. En el caso de que se cumplan las condiciones mencionadas, el tratamiento de elección constaría de un β -lactámico o un BL/IBL (meropenem, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, ceftolozano/tazobactam o ceftazidima/avibactam) en combinación con amikacina o colistina. Por el contrario, si estas condiciones no se cumplen se tratará con meropenem/piperazilina-tazobactam/ceftazidima combinado con amikacina o ciprofloxacino (130). En el caso de infecciones crónicas por *P. aeruginosa*, como es el caso de pacientes con fibrosis quística, el tratamiento de elección es tobramicina, colistina o aztreonam, aunque la cepa sea sensible a los β -lactámicos (131).

Actualmente, el número creciente de aislados *P. aeruginosa* MDR y XDR ha reducido la cantidad de antimicrobianos disponibles. Por ello se ha vuelto al uso de antiguos antibióticos como las polimixinas y fosfomicina o bien a la utilización de nuevos antibióticos, normalmente combinación de BL/IBL como ceftolozano-tazobactam, ceftazidima-avibactam e imipenem/relebactam.

Polimixinas: Mayoritariamente se usa la colistina (polimixina E) y la polimixina B. Alrededor del 99% de las cepas de *P. aeruginosa* son sensibles a colistina, y la sensibilidad en otros BGN continúa siendo alta (42). Por esta razón, actualmente su uso se ha extendido y en los últimos años se han realizado una cantidad considerable de estudios pre-clínicos y clínicos para ampliar la información sobre este fármaco (132-134). A pesar de ello, todavía hay controversia sobre la dosis intravenosa a usar (101). En el caso de *P. aeruginosa* MDR, los estudios realizados son variables debido a que se trata de series retrospectivas realizadas en un solo centro y bajo número de pacientes

INTRODUCCIÓN

(101). También se está estudiando el uso de colistina en terapia combinada. Dos trabajos indican que la combinación de colistina con otro antimicrobiano se correlaciona con mejores resultados clínicos (135,136). Además, las guías para el uso óptimo de las polimixinas recomiendan usarlas en combinación, aunque las cepas *P. aeruginosa* MDR/XDR sean sensibles a este grupo de antimicrobianos (137).

Fosfomicina: Se trata de un antiguo fármaco descubierto hace cuatro décadas, de amplio espectro y que tiene como mecanismo de acción la inhibición de la síntesis del peptidoglicano. Debido a su actividad bactericida *in vitro* frente a cepas de *P. aeruginosa* MDR, su uso intravenoso en combinación con otros antimicrobianos como β -lactámicos, aminoglucósidos o ciprofluoxacino ha resurgido como tratamiento para este tipo de infecciones (138).

Ceftolozano/tazobactam: Es una cefalosporina de quinta generación combinada con un IBL que presenta fuerte actividad anti-pseudomónica. El ceftolozano inhibe PBP5 y β -lactamasas como TEM, SHV, AmpC y oxacilinasas pero no tiene actividad frente a carbapenemasas, mientras que el tazobactam inhibe BLEE (139). La susceptibilidad a ceftolozano/tazobactam en distintas cepas de *P. aeruginosa* MDR varía entre países con valores entre el 55-96,6% (101).

Ceftazidima/avibactam (CAZ/AVI): Es otra cefalosporina de tercera generación combinada con un IBL. Avibactam presenta actividad frente a β -lactamasas de clase A y C, incluyendo BLEE, AmpC y KPC pero no presenta actividad frente a MBL (140,141). La adición de avibactam a esta cefalosporina la protege de enzimas como AmpC y otras BLEE como GES (142). Diferentes estudios han mostrado que CAZ/AVI inhibe entre el 61,1-86,5% de cepas *P. aeruginosa* MDR/XDR (101).

Imipenem/relebactam: Forma parte de los antibióticos BL/IBL. El relebactam es un inhibidor de β -lactamasas de clase A y C restituyendo la susceptibilidad a imipenem (143). Estudios *in vitro* con cepas de todo el mundo muestran que entre el 90-92% de los aislados de *P. aeruginosa* fueron sensibles a la combinación y en el caso de las cepas MDR, los aislados sensibles fueron el 71-80% (144-146).

INTRODUCCIÓN

3.3 *Enterobacterales: Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae*

El orden *Enterobacterales* es el grupo más amplio y heterogéneo de BGN con importancia clínica. Hasta el año 2016, se han descrito 60 géneros y más de 250 especies (147). Dentro de los más relevantes clínicamente se encuentra *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Serratia*, *Proteus* y *Morganella* (147). En esta tesis doctoral nos centramos principalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*. Ambos patógenos son BGN, anaerobios facultativos, oxidasa negativos y con capacidad de fermentar la glucosa. Una característica adicional de *K. pneumoniae* es la presencia de cápsula (148,149).

3.3.1 Epidemiología

En humanos, *E. coli* y *K. pneumoniae* normalmente colonizan el intestino grueso, siendo *E. coli* el microorganismo aerobio facultativo predominante en el colon (150). En el caso de *K. pneumoniae*, aparte de encontrarse en el tracto gastrointestinal, también se localiza en ambientes como suelos y aguas, además de en varios dispositivos médicos incluyendo catéteres o tubos de ventilación mecánica (151,152).

Dependiendo del sitio de infección, *E. coli* puede clasificarse en *E. coli* intestinal o diarreogénica y *E. coli* extraintestinal (148). *E. coli* intestinal se divide en seis patotipos conocidos, todos ellos, implicados en la producción de diarrea en el hospedador: (i) *E. coli* enteropatógena (ECEP), (ii) *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), (iii) *E. coli* enterotoxigénica (ECET), (iv) *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), (v) *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y (vi) *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) (153). Por otro lado, *E. coli* extraintestinal (ExPEC) produce infecciones fuera del intestino como bacteriemia, ITU e infección del tracto biliar, entre otras (154). Esta capacidad de infección es debida posiblemente a sus factores de virulencia (155). En cuanto a *K. pneumoniae*, este patógeno causa infecciones graves como neumonías, bacteriemias y ITU sobretodo en pacientes inmunodeprimidos. Además, en los últimos años ha estado muy ligado a infecciones del ámbito hospitalario (156).

Datos aportados por el ECDC en el informe epidemiológico anual de 2016 muestran que *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron el primer (14,7%) y el cuarto (4,7%) microorganismo, respectivamente, más frecuentemente aislado en infecciones de sitio quirúrgico (157). Datos similares se han observado en un estudio de prevalencia de

INTRODUCCIÓN

infecciones nosocomiales realizado en España el año 2018 (EPINE) en el cual se muestra que *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron el primer (19,1%) y el cuarto (6%) patógeno más frecuentemente aislado en humanos (158). Además, la incidencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* en las UCIs de la UE es alta, siendo ambos el primer y el tercer agente etiológico aislado en ITU, y el cuarto y el tercero en neumonía, respectivamente (24).

En cuanto a la resistencia antimicrobiana, según datos publicados por el ECDC, más de la mitad de los aislados de *E. coli* (58,3%) fueron resistentes a, al menos, un grupo de antimicrobianos que se encuentra bajo vigilancia (aminopenicilinas, fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos) en 2018 mientras que el 6,2% presentaron resistencia combinada (9). La resistencia a colistina se encontraba a niveles inferiores al 1% (42) pero con la aparición del plásmido que contiene el gen *mcr-1* y su capacidad de diseminación, se están implementando mejores métodos de detección y de vigilancia en Europa (159). En la UE/AEE se ha identificado el gen *mcr-1* en muestras humanas a partir de 2011 en países como Italia, Dinamarca, Alemania, España, Suecia y el Reino Unido (159).

En el caso de *K. pneumoniae*, exceptuando las aminopenicilinas, los grupos de antibióticos que se encuentran bajo vigilancia son los mismos que en *E. coli*. Un 37,2% de los aislados informados en 2018 fueron resistentes a, al menos, un grupo de antimicrobianos (9). La tasa de resistencia a colistina en Europa se encuentra en un 8,5%, aunque la mayor parte proceden de Grecia e Italia (42). Además, sólo ocho países aportaron datos de susceptibilidad a colistina, debido a lo cual no son datos muy representativos (42).

En cuanto a las relaciones filogenéticas, en ambos patógenos se obtienen mediante MLST. La distribución de *E. coli* alrededor del mundo es muy diversa, aunque predominan algunos ST como el ST131, ST95 ST73 y ST69 (160-162). Cabe resaltar la importancia del ST131, debido a que se trata de un clon asociado a la multirresistencia y diseminado a nivel mundial (163). En el caso de *K. pneumoniae*, los STs predominantes en todo el mundo con asociación a la resistencia antimicrobiana son el ST258, ST14 y ST15 (164,165).

INTRODUCCIÓN

3.3.2 Mecanismos de resistencia antimicrobiana

Como otras bacterias gramnegativas, el orden *Enterobacterales* presenta aislados resistentes a una amplia gama de antibióticos. Mayoritariamente, esta resistencia es debida a la captación de genes móviles contenidos en plásmidos.

3.3.2.1. Enzimas β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico resultando en la inactivación del antibiótico. Como se ha comentado anteriormente, existen cuatro tipos de β -lactamasas, todas ellas encontradas en el orden *Enterobacterales* (Tabla 3).

Las β -lactamasas de clase A incluyen enzimas de espectro reducido que confieren resistencia a penicilinas y a cefalosporinas aunque también se han encontrado con un fenotipo de resistencia más extendido como BLEE (CTX-M) y carbapenemasas (KPC). La clase B está constituida por las MBL, dependientes de zinc para realizar su actividad. Las β -lactamasas de clase C son cromosómicas y confieren resistencia a los inhibidores de β -lactamasas, como el ácido clavulánico, y cefalosporinas de tercera generación. Su expresión suele ser inducible en respuesta al antibiótico. Por último, las β -lactamasas de clase D, llamadas OXA, están compuestas por un grupo muy variado. En *Enterobacterales* las más frecuentes son OXA-1/OXA-30, que confieren resistencia a cefepime (166).

Tabla 3. β - lactamasas encontradas en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Clase	Descripción	Ejemplos
Clase A	Confieren resistencia a penicilinas y a cefalosporinas	TEM, SHV (espectro reducido) CTX-M (BLEE) y KPC
Clase B	Metalobetalactamasas. Confieren resistencia a carbapenémicos	IMP, VIM, NDM
Clase C	Presente en <i>E. coli</i> pero no en <i>K. pneumoniae</i>	AmpC
Clase D	Oxacilinasas	OXA-1/OXA30, OXA-10, OXA48 y OXA-181

INTRODUCCIÓN

3.3.2.2. Enzimas modificadoras de aminoglucósidos

Se han encontrado más de 50 genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos en *Enterobacterales*. En dos estudios multicéntricos realizados en España, se ha visto que los genes más prevalentes para *E coli* BLEE y *K. pneumoniae* BLEE fueron *aac(6')-Ib* y *aac(3)-IIa*, respectivamente (167).

3.3.2.3. Bombas de flujo

Como se ha comentado anteriormente, las bombas de flujo se clasifican en 6 familias distintas: (i) RND, (ii) MFS (iii), SMR, (iv) MATE (v), ABC y (vi) DMT. En *Enterobacterales* la familia más importante relacionada con la resistencia antimicrobiana es RND. En *E. coli* y *K. pneumoniae* podemos encontrar, entre otras, AcrAB-TolC, capaz de expulsar fluoroquinolonas, cloranfenicol, tetraciclina y tigeciclina (168), y OqxAB, que confiere resistencia a fluoroquinolonas y cloranfenicol (169).

3.3.2.4. Defectos en la permeabilidad

La modificación de la expresión de porinas en *Enterobacterales*, también modifica la resistencia a ciertos antibióticos.

Las porinas más importantes de *E. coli* en cuanto a resistencia antimicrobiana son OmpF, OmpC y OmpA. Mutantes en los genes que codifican para estas proteínas aumentan la sensibilidad a varios antimicrobianos. En el caso de *OmpF*, aumenta la sensibilidad a β -lactámicos, tetraciclina y quinolonas. *OmpC* aumenta la sensibilidad a estreptomicina y ácido fusídico y finalmente *OmpA* está implicado en la resistencia a β -lactámicos y glucopéptidos (170).

En *K. pneumoniae*, algunas de las porinas más relevantes son OmpK35 y OmpK36, homólogas de OmpF y OmpC en *E. coli*. Se ha descrito que OmpK35 y OmpK36 están implicadas en la resistencia a antibióticos como los carbapenémicos o CAZ/AVI (171,172).

INTRODUCCIÓN

3.3.2.5. Modificación de la diana

La resistencia a quinolonas puede estar mediada por la modificación de la diana. Se pueden encontrar tanto mutaciones cromosómicas como resistencia debida a plásmidos. En *E. coli*, la mayoría de mutaciones cromosómicas se encuentran en *gyrA* (173). En cuanto a la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, en *E. coli* y *K. pneumoniae* se encuentran las proteínas Qnr, que protegen la diana de las quinolonas. Un estudio realizado en España con aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* BLEE, muestra que los determinantes Qnr son poco frecuentes (3,7%), pero estos se encuentran más relacionados con las β -lactamasas SHV y CTX-M (174).

Igual que en *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae* pueden modificar el lípido A del LPS mediante la adición de pEtN y 4-amino-4-deoxy-l-arabinose (L-Ara4N), aumentando la resistencia a colistina. Se han descrito tanto mutaciones en *pmrA/pmrB* como en *phoP/phoQ* (175). Además, recientemente se ha descrito en *E. coli* y *K. pneumoniae* la resistencia a colistina mediada por plásmidos que contienen el gen *mcr*. Como se ha dicho anteriormente, el gen *mcr* constituye una familia de genes que codifican para fosfoetanolamino-transferasas que añaden residuos de PEtN al lípido A modificándolo y confiriendo niveles moderados de resistencia a colistina (176).

3.3.3 Tratamientos actuales

El tratamiento de elección para *E. coli* y *K. pneumoniae* dependerá del tipo de infección y su gravedad, así como del perfil de resistencia que presenten. Entre los antibióticos más usados se encuentran los β -lactámicos (incluyendo penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos), BL/IBL, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y fosfomicina (177). Sin embargo, el aumento de cepas resistentes de *E. coli* y *K. pneumoniae* ha aumentado limitando las opciones de tratamiento.

Cefalosporinas de tercera y cuarta generación: Antibióticos β -lactámicos que interfieren en la síntesis de la pared bacteriana. Las cefalosporinas de tercera generación incluyen cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona mientras que las de cuarta generación incluyen antibióticos como cefepima (178,179). Son ampliamente usadas para combatir infecciones graves como sepsis, infección respiratoria o infección intraabdominal causada por ambos patógenos (180). A pesar de que las cefalosporinas es el grupo de β -

INTRODUCCIÓN

lactámicos más usados, la aparición de cepas productoras de BLEE o AmpC han limitado el uso de estos antimicrobianos potenciando el uso de carbapenémicos y BL/IBL (180).

Carbapenémicos: Presentan un gran espectro de actividad y son eficaces frente a enterobacterias productoras de BLEE y AmpC (181). Se han considerado tratamiento de elección, especialmente imipenem y meropenem, en el caso de infecciones graves por enterobacterias productoras de BLEE (182). Sin embargo, el incremento de bacterias productoras de carbapenemasas como KPC, VIM o NDM está limitando el uso de estos antimicrobianos (183).

BL/IBL: Se desarrollaron debido a la aparición de β -lactamasas que limitaban el uso de β -lactámicos disponibles. Se unen a las β -lactamasas, bloqueando su acción hidrolítica y permitiendo que el β -lactámico se una a las PBPs. Las combinaciones disponibles son: ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, ceftazidima/avibactam, ceftolozano/tazobactam y el nuevo imipenem/relebactam (184). Se recomienda el uso de amoxicilina/ácido clavulánico para infecciones respiratorias, ITUs, infecciones de piel e intraabdominales (185); piperacilina/tazobactam suele usarse como tratamiento empírico de infecciones graves como bacteriemia, neumonías, ITUs complicadas e infecciones intraabdominales (186); ceftazidima/avibactam se ha empezado a comercializar recientemente y presenta actividad frente a *E. coli* y *K. pneumoniae* que no contengan MBL (187); ceftolozano/tazobactam también se trata de una combinación recientemente comercializada efectiva frente a enterobacterias productoras de BLEE (182) y por último imipenem/relebactam con cilastina recientemente aprobado por la FDA (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) para UTIs e infecciones intraabdominales complicadas causadas por *E. coli* y *K. pneumoniae* (188).

Polimixinas: Igual que en el caso de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, las polimixinas también son fármacos de último recurso en infecciones por *E. coli* y *K. pneumoniae* (189). Se recomienda que este fármaco quede reservado para infecciones causadas por cepas *E. coli* y *K. pneumoniae* MDR y sensibles a polimixinas, preferiblemente, en combinación con otros antimicrobianos (180).

INTRODUCCIÓN

Fosfomicina: Se está reutilizando de nuevo debido a su actividad frente a bacterias MDR y XDR, sobretodo en *Enterobacterales*. Fosfomicina presenta una excelente actividad *in vitro* frente a cepas BLEE de *E. coli* y *K. pneumoniae* presentando una tasa de susceptibilidad del 97% y el 81%, respectivamente (190). En clínica se usa principalmente para el tratamiento de ITUs complicadas causadas por *E. coli*. Varios estudios muestran que su eficacia es comparable a la de otros antibióticos como amoxicilina/ácido clavulánico o cefalosporinas (191). Su uso en combinación con otros antimicrobianos como meropenem se está estudiando (192).

3.4 Factores de virulencia de los BGN

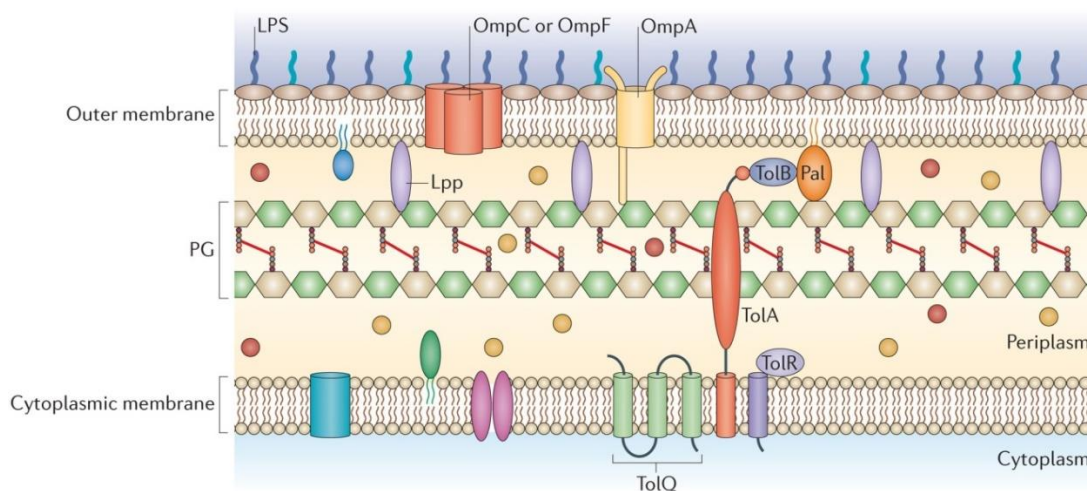
Los BGN han desarrollado una gran variedad de factores de virulencia para promover la colonización y la posterior infección del huésped, causando en última instancia la enfermedad (193). Debido a las altas tasas de resistencia y la escasez de arsenal terapéutico para combatir infecciones causadas por BGN, es importante la caracterización en profundidad de la patogénesis bacteriana y la determinación de nuevas dianas terapéuticas.

Dentro de los factores de virulencia más relevantes, encontramos componentes de la membrana externa, proteínas que facilitan la adherencia bacteriana, estructuras que permiten la motilidad bacteriana, sistemas de secreción, toxinas, vesículas de la membrana externa, presencia de sideróforos y finalmente comportamientos colectivos como la formación de *biofilm* y el *quorum sensing*. Aunque estos factores, en su gran mayoría, son compartidos entre BGN, cada patógeno está dotado de proteínas y mecanismos específicos (Tablas 4, 5 y 6).

3.4.1 Componentes de membrana externa

Los BGN presentan una envuelta celular formada por la membrana externa, peptidoglicano y membrana citoplasmática (Figura 8). La membrana externa es la primera línea de contacto entre la bacteria y el entorno, permitiendo la entrada de nutrientes necesarios para la supervivencia bacteriana pero a su vez, confiriendo protección e impidiendo la entrada de moléculas tóxicas como los antibióticos. La membrana externa está compuesta principalmente por proteínas de membrana externa (OMPs), en su mayoría porinas, fosfolípidos y LPS.

INTRODUCCIÓN



Nature Reviews | Microbiology

Figura 8. Estructura de las bacterias gramnegativas. La envuelta celular consiste en la membrana externa y la membrana citoplasmática. La membrana externa está formada por el lipopolisacárido (LPS) y diversas proteínas que actúan como porinas (OmpC/OmpF y OmpA) mientras que la membrana citoplasmática está formada por una bicapa de fosfolípidos. En el espacio periplásmico se encuentra el peptidoglicano (PG) y proteínas periplásmicas. Además, existen proteínas que confieren estabilidad a la estructura como la lipoproteína de Braun (Lpp) que une el PG con la membrana externa o las proteínas Tol y Pal que permiten la unión con la membrana citoplasmática (194).

Los componentes de la membrana externa sirven como factores de virulencia y están implicados en una gran variedad de procesos que permiten una mejor adherencia e invasión al huésped así como la evasión del sistema inmune (Tablas 4, 5 y 6).

Cabe destacar la importancia de OmpA, proteína que se encuentra altamente conservada entre especies, a la cual se le atribuyen multitud de funciones (195). En *A. baumannii*, desempeña un papel importante en la adherencia, invasión, citotoxicidad y formación de *biofilm* (196). Además, OmpA puede movilizarse a través de vesículas de membrana externa (OMV) y como se ha dicho anteriormente, contribuye a la disminución de la sensibilidad a algunos antibióticos (197). *A. baumannii* presenta otras OMPs importantes para su *fitness* y virulencia, como Omp33-36 y CarO (198,199). En *P. aeruginosa*, OprF, homóloga de OmpA, es necesaria para la virulencia de este patógeno debido a su implicación en la adhesión y su relación con determinantes del *quorum sensing* (200). En especies de *Enterobacteriales*, como en *E. coli*, se ha evidenciado que OmpA está implicada en la adhesión celular a distintos tipos celulares, como células

INTRODUCCIÓN

epiteliales, endoteliales y macrófagos (201,202). En *K. pneumoniae* OmpK36 disminuye la fagocitosis por parte de los neutrófilos y aumenta la resistencia en suero (203). La lipoproteína asociada a peptidoglicano (Pal) y la lipoproteína mureina (LppA) también confieren resistencia al suero así como protección frente a la fagocitosis (204).

3.4.2 Fosfolipasas

Las fosfolipasas (PL, del inglés *phospholipase*) son un grupo heterogéneo de enzimas encargadas de romper los enlaces éster de los fosfolípidos. Están asociadas a membranas celulares o a vesículas de membrana y se encargan de la desestabilización de las mismas así como de procesos de señalización celular. Estas funciones son debidas a que su producto de hidrólisis, los fosfolípidos, son importantes en procesos de penetración en el huésped y en la lisis celular (205). Las fosfolipasas se clasifican en cuatro grupos según su sitio de acción en los fosfolípidos: fosfolipasa A (PLA), fosfolipasa B (PLB), fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa D (PLD) (205). *A. baumannii* presenta dos PLC implicadas en la virulencia mediante la hemólisis de eritrocitos y aumento de la citotoxicidad (206). En *P. aeruginosa*, la PLC hemolítica reduce la actividad de los neutrófilos en las vías respiratorias (207). Mientras, en *K. pneumoniae*, PLD1 es importante para la virulencia en modelos murinos de neumonía (208).

3.4.3 Sistemas de secreción

Los BGN presentan seis sistemas de secreción (I-VI): sistema de secreción tipo I (T1SS), sistema de secreción tipo II (T2SS), sistema de secreción tipo III (T3SS), sistema de secreción tipo IV (T4SS), sistema de secreción tipo V (T5SS) y sistema de secreción tipo VI (T6SS), algunos más estrechamente relacionados con la virulencia bacteriana. En las tablas 4, 5 y 6 se recogen algunos ejemplos concretos. Todos ellos son sistemas transmembrana menos el T5SS que sólo se encuentra en la membrana externa (209). T1SS en su gran mayoría secreta productos que permiten la adquisición de metales o están implicados en la virulencia, como la hemolisina A, formadora de poros (210). Se encuentra ampliamente distribuido en bacterias como *P. aeruginosa* y *E. coli* y en *A. baumannii* está asociado a la formación de *biofilm* (211,212). T2SS se encarga de secretar proteínas plegadas desde el periplasma al medio extracelular. Principalmente secreta enzimas hidrolíticos como la pseudolisina en *P. aeruginosa*, la

INTRODUCCIÓN

pululanasa en *K. pneumoniae* y la invasina DraD en ECUP, todas ellas importantes para la supervivencia bacteriana en el huésped (213). El T3SS, también conocido como inyectora, se encarga de la transferencia de proteínas de virulencia, llamadas proteínas efectoras, desde el citoplasma bacteriano a la célula eucariota. Es muy relevante en la virulencia de *P. aeruginosa* y también se encuentra en ECEP y ECEH, relacionándose con la colonización del huésped y la severidad de la infección (214,215). El T4SS se diferencia de los otros sistemas de secreción en su capacidad de transferir ADN además de proteínas (216). T5SS en general transporta proteínas a lo largo de la membrana externa y no está implicado en la virulencia bacteriana (217). Por último, T6SS transloca proteínas efectoras a la célula eucariota y tiene un papel fundamental en la patogénesis bacteriana y la competición (218).

3.4.4 Toxinas

Las toxinas son determinantes importantes de la virulencia bacteriana. Además de las toxinas secretables, también se incluye la endotoxina o LPS, presente en todos los gramnegativos. En el caso de *P. aeruginosa*, una de las toxinas más importantes es la exotoxina A, secretada a través del T3SS (219). Algunos ejemplos en *E. coli* son la alfa-hemolisina (HlyA), toxina que afecta a muchos tipos celulares incluyendo células epiteliales y eritrocitos (220,221) y el factor citotóxico necrotizante 1 (CNF1), implicado principalmente en la internalización bacteriana (222).

3.4.5 Vesículas de la membrana externa (OMVs)

Las OMVs son vesículas esféricas con un diámetro de entre 20-200 nm producidas comúnmente por BGN y que son derivadas y secretadas a partir de su membrana externa (223). Están compuestas de ADN, ARN, LPS, lípidos y OMPs (194). Debido a su papel en la interacción bacteria-bacteria y bacteria-huésped las OMV suelen contener factores de virulencia como toxinas, en el caso de *E. coli*, o enzimas como proteasas y fosfolipasas como sucede en *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (224). Además, también se está estudiando su papel como adyuvantes y para el desarrollo de vacunas (225).

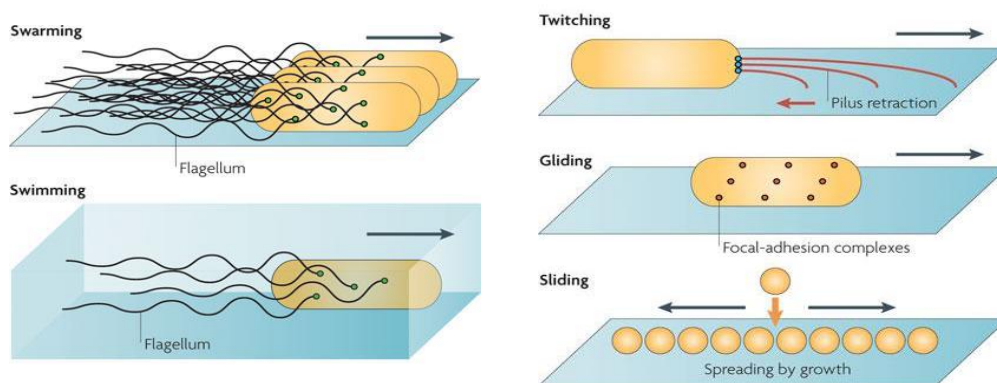
INTRODUCCIÓN

3.4.6 Sideróforos (quelantes de metales)

Los quelantes de metales son necesarios para la supervivencia bacteriana. Una de las moléculas quelantes más importantes son los sideróforos, encargados de la captación de hierro. Debido a que el hierro es un componente esencial para el crecimiento bacteriano, las bacterias han desarrollado sistemas eficientes para la adquisición del mismo promoviendo su supervivencia y crecimiento en el huésped (226). En *A. baumannii* se ha identificado la acinetobactina o la fimsbactina, la pioverdina y pioquelina en *P. aeruginosa* y por último, la aerobactina y la enterobactina han sido descritas en *E. coli* y *K. pneumoniae* (227).

3.4.7 Motilidad

Con la finalidad de desplazarse sobre distintas superficies, las bacterias emplean varios comportamientos según las estructuras que desarrollen (Figura 9). *A. baumannii* no presenta flagelo por lo tanto su movilidad es debida a la extensión de pilis tipo IV o “twitching” (228). *P. aeruginosa* presenta un flagelo polar y múltiples pilis de tipo IV (229). *E. coli* se mueve gracias a múltiples flagelos orientados axialmente a lo largo de la célula bacteriana y finalmente *K. pneumoniae* se considera un patógeno no motil, aunque algún estudio apunta a que podría presentar motilidad gracias a un flagelo polar (230,231).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 9. Motilidad bacteriana. El “swarming” consiste en un movimiento de propulsión causado por la rotación de flagelos, el “swimming” es un movimiento de bacterias individuales debido a flagelos giratorios, el “twitching” se produce por la extensión de pilis tipo IV, el “gliding” no requiere flagelos ni pilis y consiste en complejos de adhesión local y el “sliding” consiste en la translocación pasiva a una superficie promovida por el crecimiento y facilitada por un agente surfactante (232).

INTRODUCCIÓN

3.5.8 Formación de *biofilm*

La formación de *biofilm* consiste en la auto-organización de una comunidad bacteriana multicelular, embebida en una matriz de exopolisacáridos, proteínas y DNA extracelular (233). Se trata de una estructura dinámica y compleja que confiere protección a la comunidad bacteriana para sobrevivir en ambientes adversos y durante los procesos de infección (234) (Figura 10). Es un factor de virulencia importante a nivel clínico debido a que otorga a la bacteria la capacidad de colonizar tanto superficies bióticas como abióticas, protección frente a la acción del sistema inmune y fracaso terapéutico debido a la poca penetración del antibiótico en interior del *biofilm* (235,236).

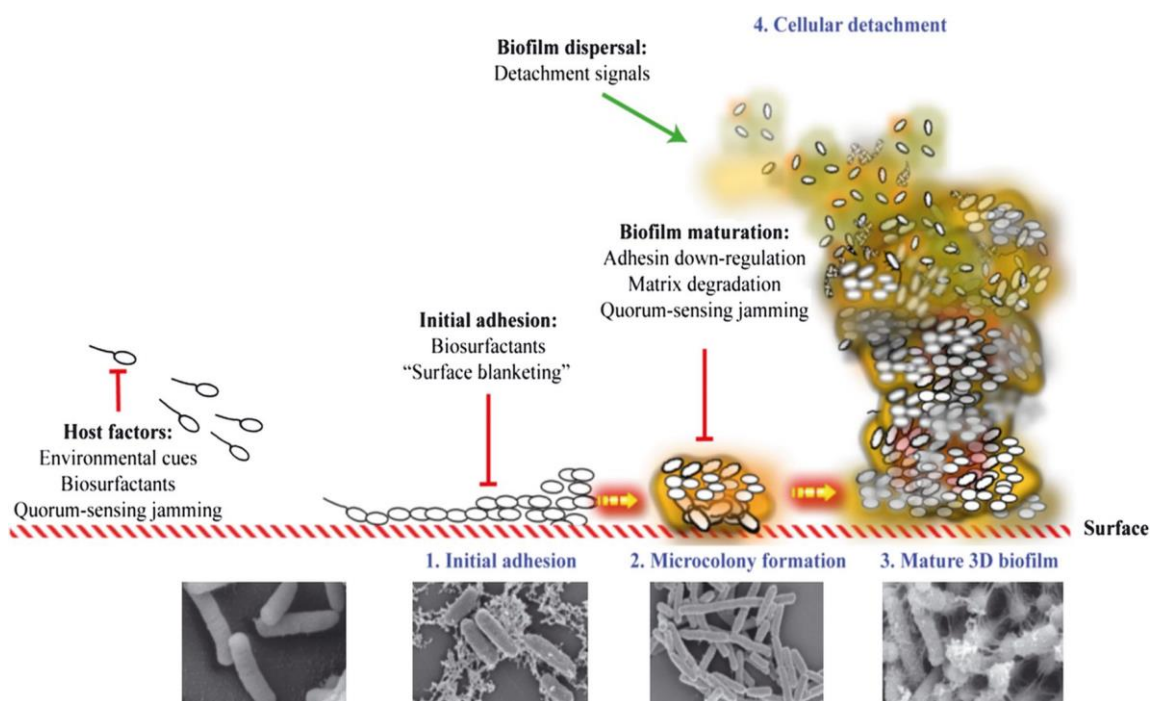


Figura 10. Formación de *biofilm*. La formación de *biofilm* es un proceso que requiere de varias etapas. Bacterias libres se acercan a una superficie y se adhieren, donde posteriormente se dividirán y se agregaran formando microcolonias dando lugar al *biofilm* maduro. Finalmente, parte de este *biofilm* se dispersará liberando bacterias que colonizarán otras superficies (240).

A. baumannii presenta genes de virulencia y proteínas que son cruciales para la formación y el mantenimiento de *biofilm* como la proteína asociada a *biofilm* (Bap) o el pili Csu, presente en la mayoría de cepas clínicas y regulado por el sistema de dos componentes BfmRS (212). La formación de *biofilm* por parte de *P. aeruginosa* es de vital importancia en pacientes con fibrosis quística. En las cepas aisladas de estos

INTRODUCCIÓN

pacientes, se han detectado mutaciones en el gen *mucA*, que junto a otros genes, contribuye a la formación de *biofilm* (238). Por otro lado, el grupo de genes *cup*, son necesarios para la formación de *biofilm* en superficies abióticas (239). En *E. coli*, la formación de *biofilm* es un fenómeno que no se ha estudiado en profundidad, pero se ha descrito una morfología de *biofilm* característica, denominada *rdar*, en cepas comensales y uropatógenicas (240).

3.5.9 *Quorum sensing*

El *quorum sensing* es un mecanismo de comunicación célula-célula mediante la excreción de compuestos químicos. Una vez alcanzado un umbral de población, las bacterias se coordinan para expresar varios rasgos colectivos como la producción de factores de virulencia o la formación de *biofilm* (241). El *quorum sensing* depende de la producción, secreción y detección de pequeños autoinductores difusibles, como lactonas acil-hemoserinas (AHL, del inglés *acyl homoserine lactones*), propias de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* o oligopéptidos autoinductores (AIP, del inglés *autoinducing peptide*), más propios de *E. coli* y *K. pneumoniae* (242).

La maquinaria de *quorum sensing* en *A. baumannii* está mediada por el sistema AbaI/AbaR, homólogo al sistema LuxI/LuxR encontrado en otras bacterias gramnegativas. AbaI es una proteína sensora, que funciona como auto-inductor y produce la síntesis de la molécula señal AHL, que en última instancia se unirá a su receptor (AbaR) induciendo una cascada de reacciones. El papel más importante de AbaI/AbaR es el desarrollo de *biofilm* (243).

P. aeruginosa presenta uno de los sistemas *quorum sensing* más complejos. Consta de tres circuitos: LasI/LasR, que produce el inductor 3O-C12-AHL; RhII/RhIR, que produce el inductor C4-AHL, ambos sistemas con inductores de tipo AHL y homólogos de LuxI/LuxR; y el sistema señal de quinolonas (PQS). Estos circuitos controlan la activación de más de 300 genes y gran variedad de procesos (244).

E. coli también presenta un homólogo de LuxR, denominado SdiA, pero no presenta LuxI y por lo tanto, no es capaz de producir la molécula señal AHL (245). Sin embargo, el sistema de *quorum sensing* más relevante en *E. coli* es luxS/AI-2, que produce autoinductores AIP. Está implicado en la comunicación intra-especie, con la finalidad de adaptarse a un ambiente tan poblado como el intestino, y además está implicado en la

INTRODUCCIÓN

adhesión, motilidad y formación de *biofilm* (245,246). Finalmente, aunque menos estudiado, el sistema AI-2 también se encuentra en *K. pneumoniae* (247).

Tabla 4. Principales factores de virulencia de *Acinetobacter baumannii* y su implicación en la patogénesis.

Factor de virulencia	Implicación en la patogénesis	Ejemplos	Referencia
Porinas	Apoptosis, adherencia e invasión, capacidad de escapar del sistema complemento, citotoxicidad, virulencia en modelos animales murinos	OmpA, Omp33-36, Caro	198, 199, 248
Fosfolipasas	Invasión, resistencia a suero, virulencia en modelos animales murinos	PLC (gen <i>AIS_0043</i>) PLD (gen <i>AIS_2055</i>)	206,249
LPS	Capacidad de escapar del sistema complemento, formación de <i>biofilm</i> , adherencia, resistencia a suero, virulencia en modelos animales murinos	BfmS, pglC, LpxC	250-252
OMVs	Contienen proteasas, liberación de factores de virulencia, transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos	OMV que contienen proteasas (gen <i>AIS_2525</i>), OMVs que contienen OmpA	253,254
Sistemas de secreción	Formación de <i>biofilm</i> , adherencia, muerte de las células del huésped, resistencia a suero y virulencia en modelos animales murinos	T1SS, T2SS, T5SS	196
<i>Quorum sensing</i>	Formación de <i>biofilm</i>	AbaI/AbaR	243
Sideróforos y otros quelantes	Persistencia y virulencia en modelos animales murinos	Acinetobactina, fimsbactina, ZnuABC, MumC/MumT	255-257

Tabla 5. Principales factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* y su implicación en la patogénesis.

Factor de virulencia	Implicación en la patogénesis	Ejemplos	Referencia
Porinas	Formación de <i>biofilm</i> , adhesión con el huésped, formación de OMVs	OprF	200,258
Fosfolipasas	Hemolítica, disminución de la actividad de los neutrófilos en las vías respiratorias, citotoxicidad en células endoteliales y monocitos	PlcHR (PLC hemolítica)	207,259
LPS	Diseminación, resistencia a suero, resistencia a la opsonización, activación cascada inflamatoria	Lípido A y antígeno O del LPS	260
OMVs	Resistencia a antibióticos, activación del <i>quorum sensing</i> , toxicidad células epiteliales de las vías respiratorias	OMV que contienen β -lactamasas, hemolisinas, moléculas del <i>quorum sensing</i> , toxina Cif	261

INTRODUCCIÓN

Sistemas de secreción	Secreción de exotoxinas que contribuyen al daño de la barrera epitelial y favorecen la colonización y secreción de otras proteínas como proteasas	T1SS (secreción de la proteasa AprA) T3SS (Secreción de exotoxinas ExoY, ExoS, ExoT y ExoU)	262
Quorum sensing	Supervivencia bacteriana, toxicidad celular, formación de <i>biofilm</i> , tolerancia frente a antimicrobianos, interacciones huésped-patógeno	LasI/LasR, RhII/RhIR y PQS	244
Toxinas	Inhibición de la síntesis proteica en las células del huésped	Exotoxina A	219
Sideróforos y otros quelantes	Colonización y supervivencia durante la infección	Pioverdina, pioquelina, HasA/HasR, ZnuABC, MgtA/MgtB	263

Tabla 6. Principales factores de virulencia de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y su implicación en la patogénesis.

Factor de virulencia	Implicación en la patogénesis	Ejemplos	Referencia
OMPs/Porinas	Evasión del sistema complemento, adhesión, invasión y colonización, virulencia en modelos animales murinos	OmpA, Pal, LppA, OmpK35, OmpK36, OmpW, OmpX	156,202,264, 265
Fosfolipasas	Virulencia en modelos animales murinos	PLD1	208
LPS y cápsula	Resistencia a suero, inhibir y evadir la fagocitosis, evasión del complemento, neutralización de la actividad antibacteriana del huésped	Antígeno O del LPS Serotipos capsulares de <i>K. pneumoniae</i> como K1 y K2	266
OMVs	Daño celular, activación del sistema inmune innato, virulencia en modelos animales murinos	OMV que contienen toxinas (Stx2a, CdtV) y hemolisinas, OMV con diverso contenido proteico	267,268
Sistemas de secreción	Adherencia, invasión y colonización, supervivencia durante la infección	T6SS	269,270
Quorum sensing	Comunicación entre especies y adaptación en el intestino. Formación de <i>biofilm</i>	SdiA, luxS-AI2	245,271
Fimbrias	Invasión celular, colonización, formación de <i>biofilm</i> , activación de células del sistema inmune, formación intracelular de comunidades bacterianas	Fimbrias de tipo I (FimA/FimH) y tipo III (MrkD/MrkA)	170,272
Toxinas	Activación del sistema inmune, citotoxicidad, invasión celular	α -hemolisina (HlyA), toxina Shiga(Stx), factor citotóxico necrotizante 1 (CNF1)	273
Sideróforos	Supervivencia y propagación durante la infección	Enterobactina, aerobactina, yersiniabactina, salmoquelina	156,274

INTRODUCCIÓN

Además, de las características que atañen a la bacteria, como mecanismos de resistencia y factores de virulencia, el sistema inmune del huésped también juega un papel importante en la resolución de la infección.

4. Sistema inmune e infección

4.1 Papel de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa

La respuesta a patógenos está mediada por la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a microorganismos y consta de mecanismos celulares y bioquímicos presentes antes de la infección y con capacidad de responder rápidamente a la misma. Los componentes principales de la inmunidad innata consisten en: barreras físico-químicas como la piel, el epitelio de las mucosas y las sustancias antimicrobianas secretadas, células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos), células dendríticas, linfocitos natural-killer y el sistema complemento (275).

Por otro lado, la inmunidad adaptativa consiste en una respuesta específica frente a una gran variedad de antígenos además de la capacidad de presentar memoria, hecho que permitirá una respuesta más rápida e intensa a exposiciones posteriores (276). La inmunidad adaptativa se divide en inmunidad humoral e inmunidad celular. Las principales células de la inmunidad humoral son los linfocitos B, capaces de secretar anticuerpos que reconocen antígenos microbianos, neutralizan y marcan a los patógenos para que éstos sean reconocidos por otros tipos celulares como los fagocitos. La inmunidad celular está mediada por los linfocitos T cooperadores (CD4+) y los linfocitos T citotóxicos (CD8+), encargados de la activación y el mantenimiento de la respuesta inmune, así como de la eliminación de patógenos intracelulares en células infectadas (275) (Figura 11).

La respuesta inmunitaria adaptativa consta de distintas fases (Figura 12). En la primera fase tiene lugar el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos vírgenes gracias a las células presentadoras de antígeno o célula dendrítica (DC, del inglés *dendritic cell*). Posteriormente, se produce la expansión clonal de aquellos clones seleccionados y finalmente se produce la activación y diferenciación de los mismos. Este proceso dura alrededor de 7 días y seguidamente, se produce la fase efectora en la

INTRODUCCIÓN

cual tiene lugar la eliminación del antígeno. Aproximadamente a los 14 días, en el caso de haberse resuelto la infección, se restaura la homeostasis con la eliminación de los linfocitos y permanecerán los linfocitos memoria generados en la fase de activación (277).

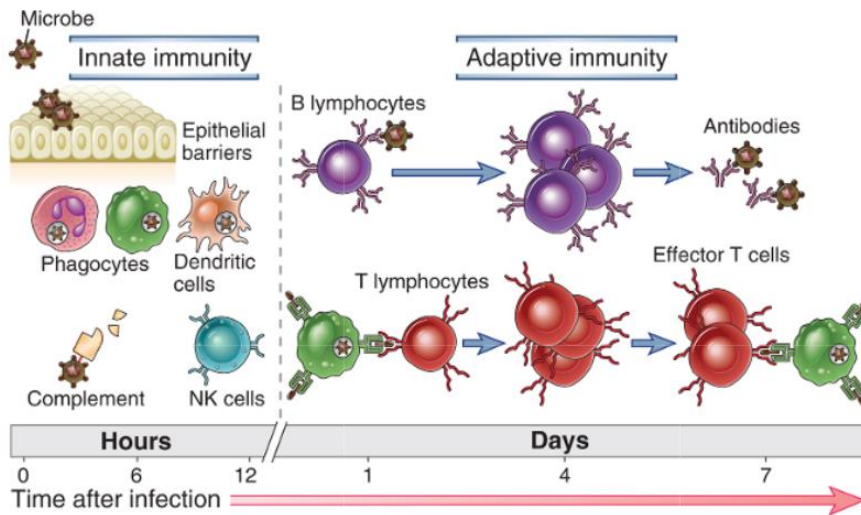


Figura 11. Inmunidad innata y adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata actúan de manera rápida y constituyen la defensa inicial contra las infecciones mientras que la inmunidad adaptativa tiene lugar posteriormente. La cinética de ambas respuestas varía según la infección (275).

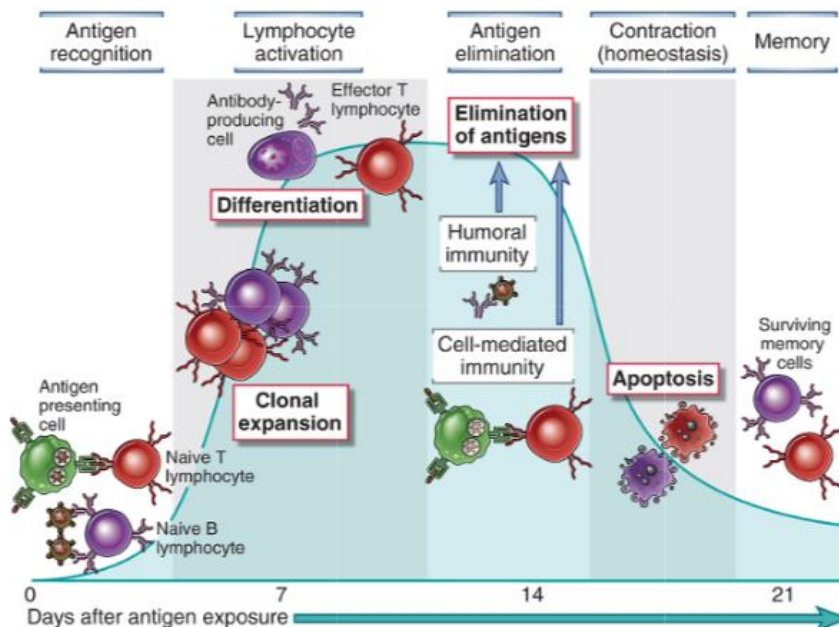


Figura 12. Fases de la respuesta adaptativa. Las primeras fases consisten en el reconocimiento del antígeno y la activación de los linfocitos. En la fase efectora, se produce la eliminación del antígeno y finalmente tiene lugar la fase de contención y se restaura la homeostasis (275).

INTRODUCCIÓN

4.2 Células de la inmunidad innata

Los principales mediadores de la inmunidad innata son las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos que derivarán de monocitos circulantes) y las células dendríticas. Todas ellas presentan marcadores de superficie específicos que nos permiten diferenciarlas de otras células (Tabla 7).

4.2.1 Neutrófilos

También llamados leucocitos polimorfonucleados, son la población de leucocitos circulantes más abundante y los mediadores de las primeras fases de la reacción inflamatoria. Los patógenos presentan patrones moleculares (PAMP, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) que son reconocidos mediante receptores de superficie, como los receptores tipo *toll* (TLR), receptores tipo NOD, o receptores de lectina, entre otros (278). Una vez se produce la unión, el patógeno es internalizado en un fagosoma, que posteriormente se une al lisosoma formando el fagolisosoma, donde tendrá lugar la liberación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y NOS) y enzimas como las α -defensinas, lisozima o elastasa, proceso que finalizará con la muerte del patógeno internalizado (277,279). Además, los neutrófilos también producen las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, del inglés *Neutrophil Extracellular Traps*), estructuras extracelulares en forma de red compuestas por proteínas citosólicas y granulares que se ensamblan en un armazón de cromatina descondensada capaz de neutralizar y eliminar bacterias (280).

4.2.2 Macrófagos

En respuesta a la infección, los macrófagos se diferencian en los tejidos a partir de monocitos circulantes (281). Existen, además, macrófagos residentes en tejidos específicos que reciben distintos nombres según el tejido en el que se encuentren: células de Kupffer (hígado), macrófagos alveolares (pulmón), microglía (sistema nervioso central) y osteoclastos (tejido óseo) (282). Igual que los neutrófilos, los macrófagos reconocen la bacteria, la fagocitan y la eliminan. Además, también reconocen e ingieren células apoptóticas después de la infección (283).

INTRODUCCIÓN

4.2.3. Monocitos

Los monocitos son células mononucleares circulantes procedentes de precursores que se encuentran en la médula ósea y que posteriormente se diferenciaron en los tejidos a macrófagos y células dendríticas (284). Los monocitos son heterogéneos y se dividen en distintas clases según la expresión de moléculas de membrana y su habilidad para diferenciarse después de la estimulación por citoquinas y/o moléculas microbianas (285). En ratón los monocitos se clasifican en monocitos inflamatorios o monocitos Ly6C^{hi}, monocitos residentes o monocitos Ly6C^{low} y monocitos intermedios o Ly6C^{int}.

4.2.3.1 Monocitos inflamatorios o monocitos Ly6C^{hi}

Expresan los marcadores de superficie CD11b, Ly6C, altos niveles de receptor de quimioquina CC2 (CCR2) y bajos niveles de receptor de quimioquina CX₃C1 (CX₃CR1). Representan entre el 2-5% de los leucocitos circulantes en situación basal y son rápidamente reclutados durante la infección. Tienen una vida media corta en sangre y no se encuentran en tejidos periféricos en situaciones no inflamatorias (286). Se diferenciarán a macrófagos o células dendríticas en los tejidos (287). Ratones deficientes en CCR2 (CCR2^{-/-}) presentan una disminución en el tráfico de monocitos Ly6C^{hi}, revelando la importancia del receptor en el proceso, así como la importancia de su quimioquina ligando, la proteína quimioatrayente de monocitos (CC2 o MCP-1 del inglés, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) (288). En humanos, corresponderían a los monocitos clásicos CD14^{hi} CD16⁻, debido a que también expresan CCR2 y pueden diferenciarse a células dendríticas (289,290).

4.2.3.2. Monocitos residentes o monocitos Ly6C^{low}

Expresan los marcadores de superficie CD11b, altos niveles de CX₃CR1, y bajos niveles de Ly6C y CCR2. Son menos prevalentes en el torrente sanguíneo y se les atribuye una función patrulla y de reparación del tejido (285). Permanecen en la circulación durante periodos de tiempo más largos y se encuentran en tejidos periféricos en situaciones no inflamatorias (286). Corresponderían a los monocitos CD14^{low} CD16⁺ o monocitos no-clásicos en términos de función patrulla (285).

INTRODUCCIÓN

4.2.3.3 Monocitos intermedios o $Ly6C^{int}$

Solo representan el 5% del total de los monocitos circulantes. Podrían corresponder a los monocitos $CD14^+ CD16^+$ en humanos (290).

Cabe destacar que las clases de monocitos en humanos y ratones no se solapan, aunque su contribución a la defensa inmunitaria puede ser similar (291). En el caso de los humanos, los monocitos $CD14^{low} CD16^+$ responden con altos niveles de citoquinas después de la estimulación por los TLR, mientras que en ratón, la clase que produce una mayor respuesta a TLR son los $Ly6C^{hi}$ (que en términos de marcadores de superficie serían más parecidos a los $CD14^{hi} CD16^-$ o clásicos). Por este motivo, el hecho de designar a los monocitos $CD14^{low} CD16^+$ el nombre de monocitos pro-inflamatorios en humano y a los monocitos $Ly6C^{hi}$ como monocitos pro-inflamatorios en ratón puede generar confusión (290).

4.2.4 Células dendríticas (DC)

Las DC son las células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *Antigen Presenting Cells*) por excelencia y por lo tanto, su función principal es la activación de los linfocitos vírgenes. En respuesta a la activación por bacterias, las células dendríticas migran a los ganglios linfáticos donde presentan el antígeno a los linfocitos y estos son activados (275). Existen varias clases de DC clasificadas según su ontogenia, pero que a menudo correlaciona también con su función (292). Las distintas clases de DC se encuentran representadas en la figura 13 y sus marcadores característicos se encuentran en la tabla 7.

4.2.4.1 Células dendríticas convencionales o clásicas (cDC)

Su función es la presentación de antígeno mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I o MHC-II) tanto a los linfocitos $CD4^+$ como a los $CD8^+$. Se subdividen en cDC de tipo I y cDC de tipo II (293). Las cDC de tipo I están más asociadas a la presentación cruzada, es decir, la presentación de antígenos exsolubles o antígenos asociados a células debido a que han sido fagocitados. Estos antígenos son presentados a los linfocitos T $CD8^+$ mediante el MHC-I (294). Por el contrario, las cDC

INTRODUCCIÓN

de tipo II, están más especializadas en la presentación de antígenos a los CD4+ mediante el MHC-II (295).

4.2.4.2 Células dendríticas plasmocitoides (pDC)

Presentan principalmente antígenos virales, como ADN vírico, mediante el MHC-II y producen elevadas cantidades de interferón de tipo I (INF tipo I) (296). En el caso de la infección bacteriana, hay estudios que indican que las pDC no son capaces de fagocitar bacterias (*E. coli* y *S. aureus*) y requieren de las DC de origen mieloide para responder a estímulos bacterianos (297), mientras que otros trabajos muestran que las pDC son activadas por bacterias como *S. aureus* (298). Más estudios son necesarios para conocer la función de las pDC en respuesta a una infección bacteriana.

4.2.4.3 Células dendríticas derivadas de monocitos (moDC)

Como consecuencia de la infección o la inflamación, se origina un tipo de célula dendrítica a partir de monocitos que se encuentran en órganos linfoides y en no linfoides. Estas DC se denominan DC derivadas de monocitos (moDC) e incluyen una población de DC que se caracteriza por la producción de TNF- α y la enzima óxido nítrico inducible (iNOS), llamadas TipDC (299), y un grupo celular bastante heterogéneo llamado DCs inflamatorias (iDC) (300). Fenotípicamente, son difíciles de distinguir de las cDC debido a la expresión similar de marcadores como CD11b, CD11c y MHC-II. Por ello, son necesarios más estudios para clarificar la definición de este tipo celular.

4.2.4.4 Células de Langerhans

Consisten en una población única restringida a la epidermis de la piel que presenta MHC-II. Se han considerado células centinela, que patrullan el tejido y migran a los nódulos linfáticos que drenan la piel donde activarán a los linfocitos T en el caso de detectar algún antígeno (301).

INTRODUCCIÓN

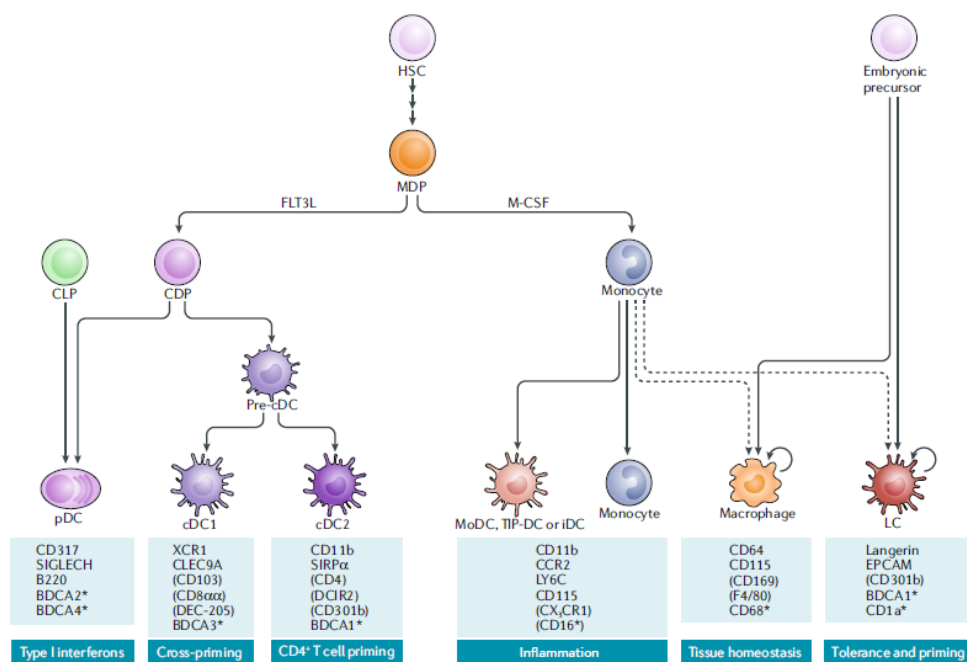


Figura 13. Clases de células dendríticas. Precusores, marcadores y función principal de los distintos tipos de célula dendrítica (302).

Tabla 7. Marcadores de las células de la inmunidad innata. Los marcadores celulares difieren entre tipos celulares y entre distintas clases dentro de la misma población.

Células	Marcadores murinos	Marcadores humanos
Neutrófilos	CD11b+, Ly6C+, GR1+	CD11b+, CD66+
Macrófagos	CD11b+, F4-80+, CD68+	CD11b+, CD68+, CD163+
Monocitos pro-inflamatorios o Ly6C ^{hi}	CD11b+, Ly6C ^{hi} , CCR2+, CX ₃ CR1 ^{low}	CD14 ^{hi} , CD16-, CCR2+ (monocitos clásicos)
Monocitos residentes o Ly6C ^{low}	CD11b+, Ly6C ^{low} , CCR2 ^{low} , CX3CR1 ^{hi}	CD14 ^{low} CD16+ (monocitos no-clásicos o pro-inflamatorios)
Monocitos intermedios o Ly6C ^{int}	CD11b+, Ly6C ^{int}	CD14+ CD16+
Células dendríticas convencionales tipo I (cDC tipo I)	CD11c+, CD8+, MHCII+, CD11b ^{low}	CD11c+, HLADR+, CD141+
Células dendríticas convencionales tipo II (cDC tipo II)	CD11c+, CD11b+, MHCII+, CD8-	CD11c+, HLADR+, CD1c+
Células dendríticas plasmocitoides (pDC)	CD11c ^{low} , MHCII ^{low} , Ly6C+	CD11c ^{low} , MHCII ^{low} , CD123+
Células dendríticas derivadas de monocitos (moDC)	CD11c+, CD11b+, MHCII+,	-
Células de Langerhans	MHCII+, langerina, CD11b+, F4-80+	MHCII+, langerina, CD1a+, CD11b+

INTRODUCCIÓN

4.3 Maduración y migración de las células de la inmunidad innata

4.3.1 Maduración en la médula ósea

Los monocitos se generan continuamente en la médula ósea. Las células madre hematopoyéticas (HSC del inglés, *Hematopoietic Stem Cells*), se diferencian a precursores de macrófagos y células dendríticas (MDP del inglés, *Macrophage Dendritic cell Progenitors*), posteriormente al progenitor común de monocitos (cMoP) y finalmente se diferenciarán a monocitos Ly6C^{hi} o Ly6C^{low}. Los monocitos Ly6C^{hi} serán reclutados rápidamente a los sitios de infección bacteriana donde se diferenciarán en macrófagos y DC mientras que los Ly6C^{low} se diferenciarán en macrófagos que tendrán como función patrullar y reparar el tejido endotelial (285).

Los neutrófilos son generados en la médula ósea a partir de precursores bajo la regulación del factor estimulante de granulocitos (G-CSF del inglés, *Granulocyte Colony Stimulating Factor*). Su producción se regula en función de la apoptosis producida en los tejidos. Cuando los macrófagos y las DC fagocitan neutrófilos apoptóticos, ambas células reducen la producción de IL-23. IL-23 estimula la producción de IL-17A, que actúa como estímulo importante de G-CSF. Por lo tanto, la producción de G-CSF se ve reducida cuando el número de neutrófilos en los tejidos aumenta (303).

4.3.2 Migración y quimioquinas responsables

Los monocitos son reclutados a los sitios de infección con la finalidad de mediar una respuesta antimicrobiana (290). Aunque los monocitos Ly6C^{low} pueden ser reclutados, el reclutamiento de Ly6C^{hi} es mucho más prominente (304). Como se ha comentado anteriormente, los monocitos presentan un receptor llamado CCR2 que se une a dos ligandos: CCL2 (también conocido como MCP-1) y CCL7 (también conocido como MCP-3) (288). Esta unión quimioquina-receptor es responsable de la migración de estas células desde la médula ósea hasta la sangre. La expresión de CCR2 está restringida a pocos tipos celulares, sin embargo, MCP-1 puede ser secretada prácticamente por todas las células nucleadas en respuesta a citoquinas y moléculas microbianas (305) (Figura 14).

INTRODUCCIÓN

En el caso de las infecciones bacterianas, este proceso ha sido estudiado principalmente en *Listeria monocytogenes* (305), pero no en BGN. Cuando se produce la infección bacteriana, ésta es detectada y aumenta la liberación de MCP-1 en sangre y en tejidos (306), así como por parte de las células de la médula ósea (307). La unión de MCP-1 con su receptor promueve la migración de los monocitos desde la médula ósea hasta el torrente sanguíneo (308). Posteriormente, se produce la migración de los monocitos a los tejidos, donde podrán diferenciarse en TipDC, población que se caracteriza por la producción de TNF- α e iNOS, (299) y en macrófagos (309) (Figura 14). Sin embargo, el tráfico de monocitos a los sitios de infección, como el bazo y el hígado, es independiente de CCR2 (308,310).

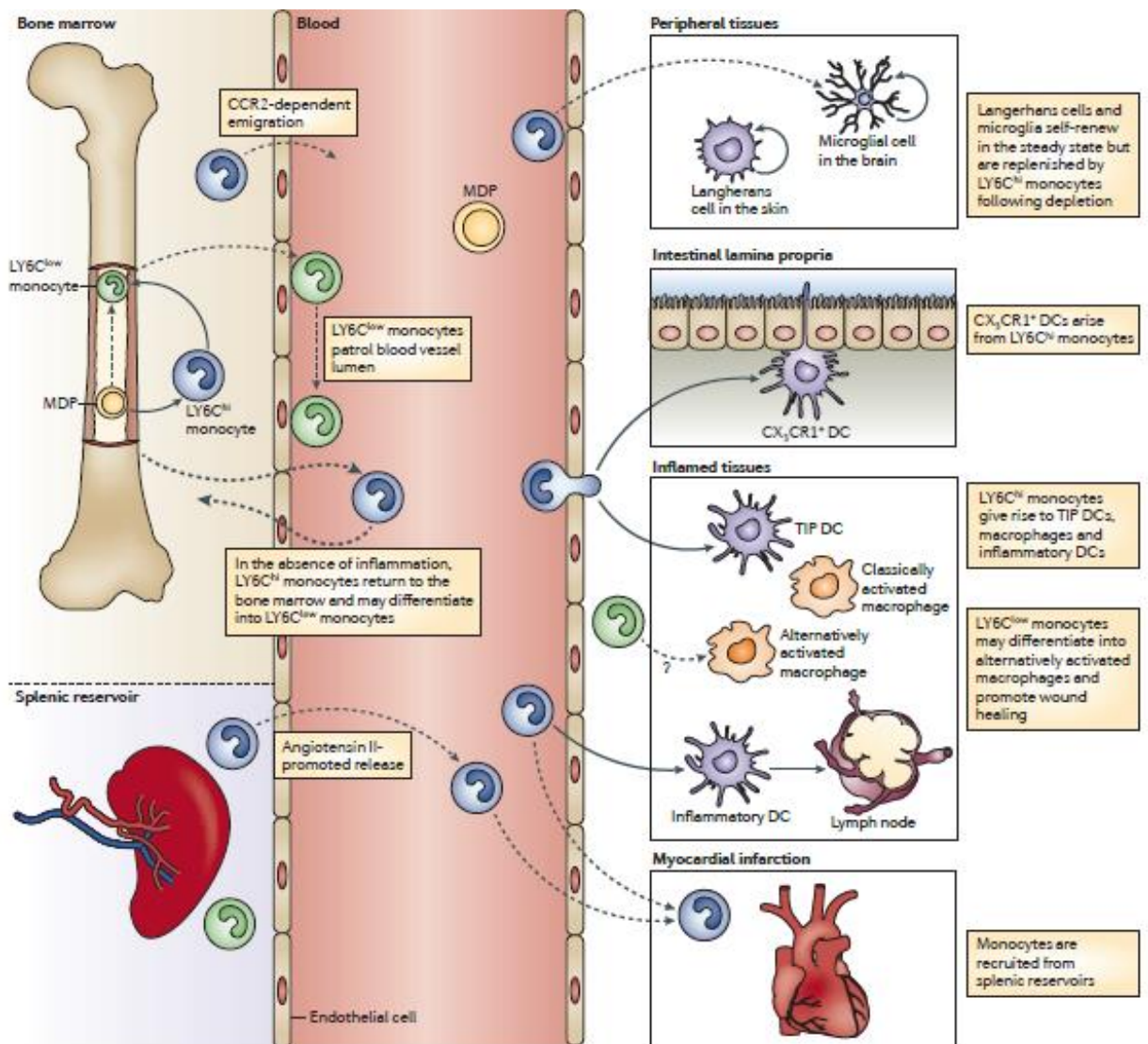


Figura 14. Tráfico de monocitos. Las células precursoras de macrófagos y células dendríticas (MDP) dan lugar a los monocitos Ly6C^{hi} que: a) en ausencia de infección pueden retornar a la

INTRODUCCIÓN

médula ósea y diferenciarse en Ly6C^{low} o b) en respuesta a la infección migran a la sangre de manera CCR2 dependiente y posteriormente a los tejidos inflamados donde darán lugar a macrófagos, DC inflamatorias y TipDC. Los monocitos Ly6C^{low} también pueden ser reclutados a los sitios de inflamación y diferenciarse a macrófagos alternativos, posiblemente contribuyendo a la reparación del tejido. Además, experimentalmente se ha visto que los monocitos Ly6C^{hi} pueden dar lugar células de Langerhans, microglía y macrófagos intestinales. Por otro lado, después de un infarto de miocardio, los monocitos Ly6C^{hi} de los reservorios esplénicos, son selectivamente reclutados al tejido cardíaco dañado (285).

Por otro lado, la migración de los neutrófilos está controlada por los receptores CXCR4 y CXCR2, presentes en células de la médula ósea (303). CXCR4 se encarga de retener los neutrófilos en la médula ósea para su posterior liberación (311), mientras que la liberación estará mediada por la unión del receptor CXCR2 con sus ligandos CXCL1 y CXCL2 (también llamados KC y MIP-2, respectivamente) (312). Por lo tanto, la retención o la liberación de neutrófilos estará determinada por el balance entre CXCR4 (favorece la retención) y CXCR2 (favorece la liberación).

Los neutrófilos migran a los tejidos mediante un proceso multipaso. Primero se produce el anclaje (*tethering* en inglés) y el rodamiento (*rolling* en inglés), dependiente de selectinas. A continuación se produce la adhesión al endotelio vascular, el *crawling* que consiste en el desplazamiento sobre el endotelio y finalmente la transmigración al tejido infectado (313).

4.4 Respuesta inmune durante la infección bacteriana

La sepsis es una de las infecciones bacterianas en las que se genera una desregulación de la respuesta inmune. En la sepsis, la respuesta inmune generada frente a un patógeno por parte del huésped no puede regresar a la homeostasis, hecho que culmina en una inflamación generalizada excesiva y sostenida unida a una supresión inmune (314).

La excesiva inflamación en la sepsis está asociada con una potente activación del sistema inmune innato, mediado por la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptors*) por parte de los PAMPs y los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, del inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*). La activación por parte de DAMPs, además, provoca un círculo de retroalimentación que implica la continua activación del sistema inmune y disfunción orgánica (315). La respuesta inflamatoria durante la sepsis se caracteriza por una

INTRODUCCIÓN

excesiva activación del sistema complemento, mayor coagulación y mayor liberación de citoquinas pro-inflamatorias por parte de las células endoteliales y leucocitos. El sistema complemento es esencial para la protección frente a patógenos, pero su activación descontrolada puede causar daño tisular (316). C5a, producto de la cascada del complemento, es un potente quimioatrayente implicado en el reclutamiento de neutrófilos, eosinófilos, monocitos y células T y además, promueve la activación de células fagocíticas. Cuando ambas funciones se encuentran descontroladas, pueden ocasionar daño tisular y disfunción orgánica (317). El bloqueo de C5a mejora la supervivencia frente a distintos modelos animales (318,319). La inhibición del factor tisular, una de las proteínas principales implicadas en la coagulación, previene la disfunción orgánica y la mortalidad en un modelo de sepsis (320). Finalmente, el bloqueo de citoquinas implicadas en la patogénesis de la sepsis como TNF- α , IL-12, IL-18 o IL-1 β también previene la mortalidad en un modelo de sepsis (321).

Por otro lado, también tiene lugar la supresión del sistema inmune. Se produce una depleción de las células B y de las células T CD4⁺ y CD8⁺ debido al aumento de la apoptosis (322). Además, también se produce el agotamiento de las células T, es decir, la pérdida progresiva de la función efectora debido a una estimulación de antígeno prolongada (323). En cuanto a los neutrófilos, se produce un retraso en la apoptosis, así como un aumento en la liberación de neutrófilos inmaduros a la circulación. Por ello, los pacientes con sepsis presentan mayor número de neutrófilos circulantes con distintos grados de maduración (324). Además, se ha observado una pérdida de función de los mismos, hecho que incluye una menor eliminación de la bacteria y menos producción de ROS (325). Las DC también se ven reducidas por un aumento en la apoptosis y disminuye su capacidad de presentación de antígeno (326,327). Por último, también se ha observado que monocitos-macrófagos se vuelven tolerantes al antígeno y no son capaces de responder correctamente a estímulos bacterianos (328).

5. Nuevas estrategias para tratar las infecciones por BGN

El incremento de la resistencia antimicrobiana junto con la falta de desarrollo de nuevos antimicrobianos supone un problema clínico de enorme magnitud. La ausencia de nuevos antibióticos es debida a la dificultad y al tiempo que comporta el desarrollo de los mismos. De todos los compuestos desarrollados en la fase preclínica, solo el 2% es aprobado, en un proceso que puede conllevar más de 10 años (Figura 15) (329).

INTRODUCCIÓN

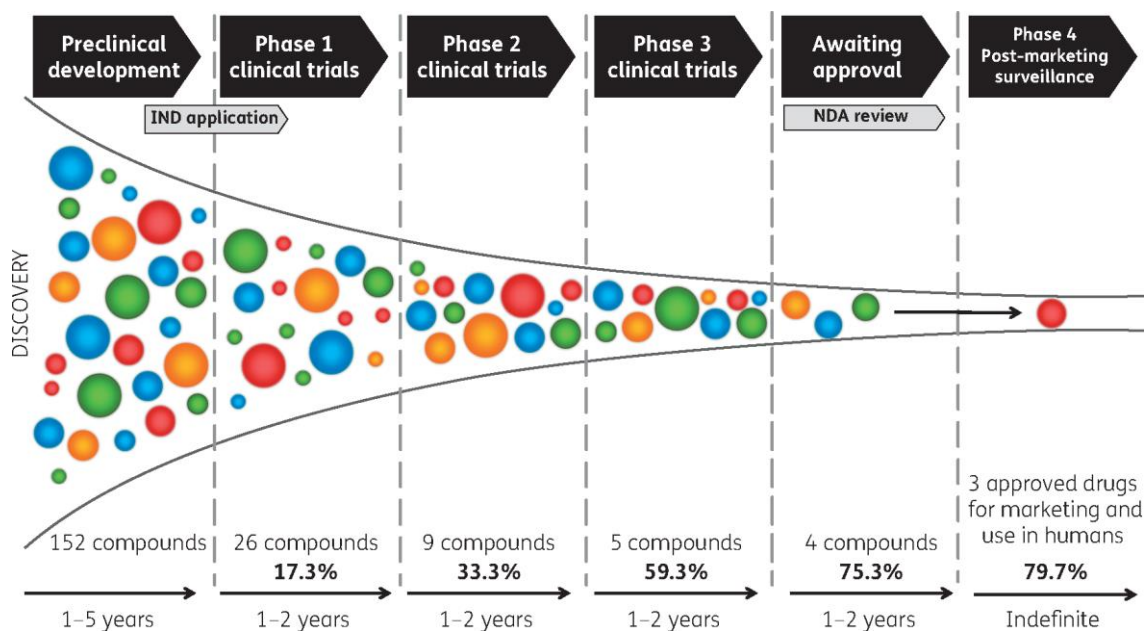


Figura 15. Fases de descubrimiento de un fármaco. Un número razonable de compuestos se encuentran en la frase preclínica, sin embargo, este número va decreciendo a medida que se avanza en las fases de ensayo clínico hasta que llega al mercado (329).

Para aumentar el arsenal terapéutico y combatir la resistencia antimicrobiana, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas como el uso de antiguos antimicrobianos, el desarrollo o la búsqueda de moléculas no antimicrobianas que actúen frente a la bacteria sin presentar efecto bactericida o bacteriostático, moléculas que actúen a nivel del huésped o el reposicionamiento de fármacos, entre otras (Figura 16). A nivel general, los estudios preclínicos de moléculas antibacterianas son llevados a cabo por pequeñas-medianas empresas. Alrededor del 50% de los proyectos focalizados en la búsqueda de nuevos compuestos, está destinado a aquellos que presentan una acción directa frente a la bacteria (antibióticos tradicionales) mientras que la otra mitad se reparte en otras alternativas terapéuticas como la terapia de fagos, el diseño de vacunas o el reposicionamiento de fármacos (330).

INTRODUCCIÓN

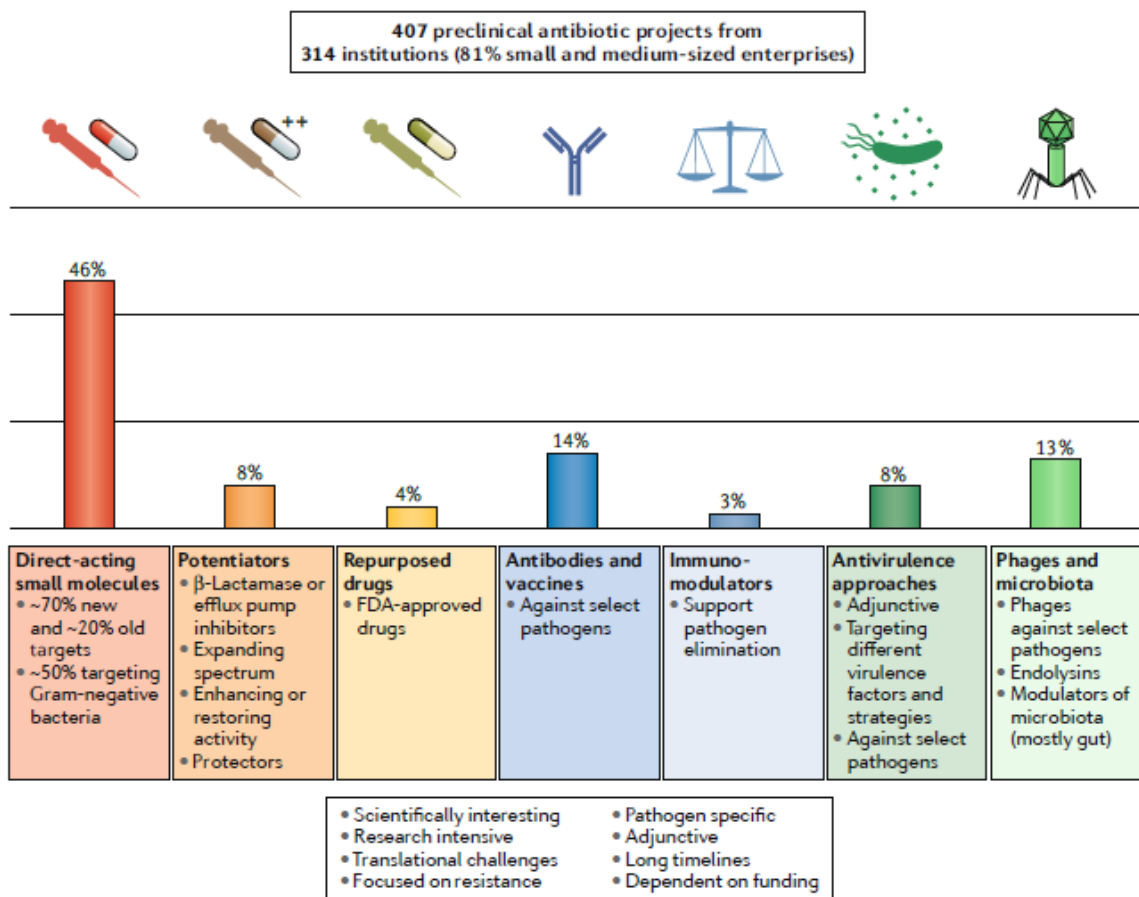


Figura 16. Estudios preclínicos destinados al desarrollo de fármacos. Número de estudios destinados al descubrimiento de nuevas terapias antimicrobianas enfocando distintas estrategias (330).

5.1 Antiguos antibióticos

Debido a la problemática de la resistencia antimicrobiana, antibióticos que habían quedado en desuso vuelven a tener cabida frente a infecciones causadas por BGN multirresistentes para los cuales las opciones terapéuticas son muy limitadas. Entre ellos se encuentra la colistina, para la cual se ha obtenido una mejor caracterización de la farmacocinética (331) y se está estableciendo la dosis óptima (132). La fosfomicina fue descubierta en los años 60 y fue rápidamente abandonada debido a la disponibilidad de otras moléculas. Actualmente, vuelve a usarse en la práctica clínica, generalmente frente a *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos (332). Finalmente, este año se ha iniciado un ensayo clínico en el cual se compara la actividad de temocelina, un antiguo β -

INTRODUCCIÓN

lactámico, y meropenem para el tratamiento de bacteriemia por *Enterobacterales* resistentes a cefalosporinas de tercera generación (333).

5.2 Terapia de fagos

Consiste en el uso de bacteriófagos, virus capaces de lisar bacterias de manera específica. Fueron descubiertos hace un siglo pero su uso quedó restringido a los países pertenecientes a la Unión Soviética. Actualmente, debido al problema de la resistencia antimicrobiana, su uso vuelve a ser de interés (334). Los fagos líticos se unen a receptores de la superficie bacteriana, vierten su contenido genético, se replican, forman nuevas partículas víricas y escapan del citoplasma produciendo la lisis bacteriana, actividad que podría ser comparable a la actividad bactericida de un antibiótico, y que además, puede auto-amplificarse debido a que las nuevas partículas víricas infectarán nuevas células (335). Una de las ventajas es que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden ser específicos de cada patógeno, incluso de cada cepa, y por lo tanto no dañan la microbiota (336). Los fagos se pueden administrar de diversas maneras. La terapia convencional consiste en usar un único fago o un cocktail de fagos, que puede tener como diana una única especie bacteriana o bien ser de amplio espectro (337). Actualmente, en Rusia y Georgia, se comercializa un cocktail de fagos llamado Pyophage (PYO), que contiene fagos dirigidos a *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis* y *Streptococcus pyogenes* (338). La combinación de fagos y antibióticos también ha sido estudiada presentando eficacia tanto *in vitro* como *in vivo* frente a los patógenos ESKAPE (339). Por último, también se ha estudiado la utilización de proteínas derivadas de fagos así como fagos diseñados mediante bioingeniería (337). Actualmente, existe una gran variedad de estudios preclínicos en modelos murinos y ensayos clínicos que evalúan la actividad de los fagos frente a *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae* (334,335).

5.3 Inhibidores de factores de virulencia

El mayor conocimiento de la patogénesis bacteriana y la comunicación celular ha revelado la existencia de muchas dianas terapéuticas potenciales que podrían ser útiles para tratar enfermedades causadas por bacterias (340). La inhibición de la virulencia está resultando una estrategia bastante convincente debido a que es posible que se ejerza

INTRODUCCIÓN

una menor presión selectiva para el desarrollo de resistencias que con las terapias tradicionales (341).

Las terapias anti-virulencia se están centrando en actuar contra factores o mecanismos del patógeno que sean cruciales para el inicio de la infección y para causar enfermedad. Esto conlleva a interferir en la adherencia e invasión celular, en la replicación en el interior del huésped, en mecanismos para escapar de la respuesta inmune, en la capacidad de formación de *biofilm* y finalmente en la comunicación celular y la capacidad de adaptación al ambiente del huésped (342). Además, estas moléculas anti-virulencia podrían usarse en combinación con antibióticos consiguiendo una mayor eficacia terapéutica (66,343).

5.3.1 Inhibidores de la adherencia bacteriana

Las bacterias usan pilis, fimbrias y adhesinas para entrar en contacto con la célula del huésped. Muchos pilis se ensamblan en la célula bacteriana gracias a una vía dependiente de chaperonas (*chaperone usher pathway*) (344). Se ha encontrado que pequeñas moléculas inhibitoras de esta vía impiden la formación de pilis de ECUP (345,346). En otro estudio en el cual se utilizan antagonistas de las lectinas FimH, presentes en el pili, también se observa una menor colonización e invasión del epitelio por parte de ECUP, traducándose en una disminución de la carga bacteriana en vejiga y orina en un modelo murino de ITU (347).

Un gran número de patógenos usa proteínas de la membrana externa para entrar en contacto con el huésped, invadir tejidos y escapar de la respuesta inmune. En este contexto, se han desarrollado inhibidores de las OMPs. El péptido AOA-2 se une a OmpA produciendo una inhibición de la adherencia de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* a las células del huésped *in vitro* además de disminuir la mortalidad y reducir la carga bacteriana en modelos murinos de sepsis peritoneal (348). Dándole un valor añadido, se ha visto que AOA-2 también presenta sinergia *in vivo* con colistina (66).

5.3.2 Inhibidores del *quorum sensing*

Las bacterias pueden emplear la comunicación intracelular para cambiar sus perfiles de transcripción e inducir la expresión de factores de virulencia (349). Esta comunicación,

INTRODUCCIÓN

a su vez, está estrechamente relacionada con el control de la formación de *biofilm*, responsable de una amplia variedad de infecciones nosocomiales (350).

Debido a que *P. aeruginosa* presenta uno de los sistemas de *quorum sensing* más complejos, se han realizado una gran variedad de estudios con este patógeno. Existen compuestos naturales como los flavonoides que inhiben el *quorum sensing* de *P. aeruginosa* mediante la inhibición de LasR y RhIR (351). Las furanonas son capaces de reducir la colonización y la mortalidad en modelos murinos de neumonía (352) y enzimas que degradan la molécula señal lactona acil-hemoserina o inhibidores del receptor PqsR presentan eficacia frente a modelos de infección por quemaduras (353,354). Sin embargo, la eficacia de los inhibidores de *quorum sensing* y su relevancia a nivel clínico no ha sido ampliamente testada debido a que solo se han realizado ensayos con aquellos compuestos que ya estaban previamente aprobados como la azitromicina o el anticancerígeno 5-fluorouracilo (5-FU) (355).

5.3.3 Inhibidores de los sistemas de secreción

Los inhibidores de los sistemas de secreción pueden actuar a distintos niveles: evitando el ensamblaje del propio sistema, inhibiendo su interacción con el huésped o bien impidiendo la secreción de los efectores del sistema (340). Existen seis tipos de sistemas de secreción mencionados anteriormente, y en alguno de los casos su función consiste en la translocación de efectores bacterianos, comúnmente toxinas, al citoplasma de la célula huésped (356). Uno de los más relevantes en el caso de los BGN es el sistema de secreción tipo III. El primer inhibidor de este sistema fue descubierto por Linington *et al.* frente a ECEP (357). Posteriormente, se han identificado otros inhibidores como TS027 y TS103, que inhiben la transcripción de ExoS, componente del sistema de secreción de tipo III de *P. aeruginosa* (358).

5.3.4 Inhibidores de toxinas

La neutralización de las toxinas bacterianas también es una buena estrategia anti-virulencia. Actualmente se encuentra en el mercado un compuesto llamado Synorb-Pk, un inhibidor de la unión de la toxina Shiga de ECEH con su receptor Gb3, presente en el riñón (359). Además, se está desarrollando un ensayo clínico de fase II con un

INTRODUCCIÓN

anticuerpo denominado Shigamab dirigido frente a las toxinas Stx2 de *E. coli* en pacientes con síndrome urémico hemolítico (360).

5.4 Moléculas con acción sobre el sistema inmune

Moléculas que tienen como diana la modulación o activación del sistema inmune del huésped pueden ser eficaces a la hora de resolver la infección bacteriana. Sin embargo, es conveniente usarlas como adyuvantes al tratamiento antimicrobiano (361).

5.4.1 Moléculas moduladoras de la respuesta inmune

La lisofosfatidilcolina (LPC) es un componente de los fosfolípidos de las células eucariotas que tiene como función el reclutamiento y la activación de monocitos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos T (362). Se ha demostrado que la LPC en monoterapia aumenta la supervivencia en modelos murinos de ligación cecal y punción por *E. coli* y en modelos de sepsis peritoneal por *A. baumannii* (363,364). Además, presenta eficacia *in vivo* en combinación con antimicrobianos como colistina, tigeciclina o imipenem para *A. baumannii* multirresistente o con ceftazidima e imipenem para *P. aeruginosa* multirresistente (365,366). La terapia con el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), también ha mostrado buenos resultados en pacientes con sepsis causada por bacterias grampositivas y gramnegativas (367). Finalmente, la administración de anticuerpos bloqueando el eje PD-1/PD-L1 (receptor-ligando), conocido por su elevada expresión en los linfocitos T de pacientes con sepsis, mejora la supervivencia en modelos animales de sepsis por punción y ligación cecal (368).

5.4.2 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos pueden tener una acción directa sobre la bacteria pero además, promover la activación del sistema inmune para ayudar al huésped a controlar la infección. Existen varios péptidos como el IMX942 o el hLF-1-11 en fase preclínica y clínica (369). Las defensinas hBD-2 y hBD-3, péptidos pertenecientes al sistema inmune innato de los humanos, presentan actividad bactericida frente a cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*. (370,371). El péptido antimicrobiano humano LL-37,

INTRODUCCIÓN

también presentó actividad frente *A. baumannii* MDR, *P. aeruginosa* hipervirulenta y *K. pneumoniae* resistente a colistina (372-374).

5.5 Anticuerpos y vacunas

Existe un amplio repertorio de estudios con la finalidad de encontrar anticuerpos y vacunas frente a BGN. Varios trabajos se han centrado en la obtención de vacunas frente a BGN como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* (375-377), mostrando resultados prometedores en modelos murinos. Además, algunos estudios en los cuales se desarrollan vacunas frente a estos tres patógenos han pasado a fase clínica (377,378). Por último, Ali *et al.* han desarrollado un anticuerpo monoclonal bivalente capaz de unirse a dos proteínas distintas de *P. aeruginosa* que se encuentra en fase I (379).

5.6 Reposicionamiento de fármacos

El descubrimiento y desarrollo de nuevos antimicrobianos, aunque continúa siendo una necesidad urgente, implica un enorme gasto de tiempo y de recursos. Esta situación, junto con el corto margen de aplicación terapéutica debido a la rápida aparición de resistencias, ha provocado que en los últimos años el interés de generar nuevos antibióticos por parte de las grandes compañías farmacéuticas sea cada vez menor.

En este contexto, ha surgido la estrategia del reposicionamiento de fármacos, es decir, encontrar una nueva indicación para un fármaco que ya está comercializado. Este “reciclaje” conlleva una reducción en los costes y el tiempo empleados (Figura 17) (380).

INTRODUCCIÓN

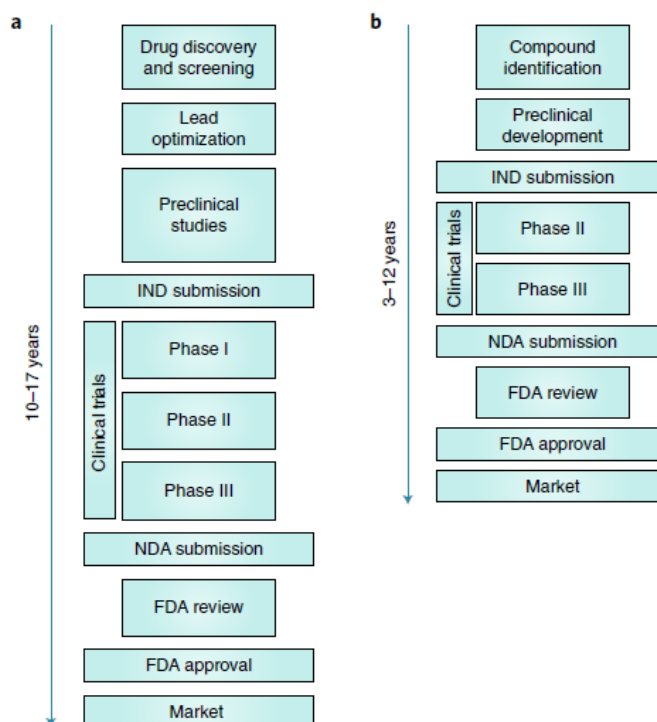


Figure 17. Representación esquemática de los procesos regulatorios a los que están sujetos los compuestos tradicionales versus los compuestos reposicionados. El nuevo compuesto es descubierto, posiblemente va a tener que ser modificado para su optimización, será evaluado en estudios preclínicos y posteriormente tiene que ser testado en humanos en ensayos clínicos (fase I-III). Si pasa estas fases, será aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA del inglés *Food and Drug Administration*) y posteriormente se pasará a su comercialización. En el caso del compuesto reposicionado, no es necesaria su modificación y como ya ha pasado estudios de seguridad, entra directamente a Fase II (380).

Existen varias aproximaciones tanto *in vitro* como *in vivo* de diferentes fármacos candidatos a ser reposicionados como agentes antimicrobianos, recogidas en el primer artículo de revisión de esta tesis doctoral (Artículo 1). Dentro de las familias de fármacos reposicionados, esta tesis doctoral se centra principalmente en los anticancerígenos que presentan como mecanismo de acción la modulación del receptor de estrógenos (SERM del inglés *selective estrogen receptor modulators*) y en los antihelmínticos de la familia de las salicilanilidas.

Algunos fármacos anticancerígenos han mostrado también actividad antibacteriana. Uno de ellos es el tamoxifeno, perteneciente a los SERM y ampliamente usado para el tratamiento de cáncer de mama, presenta actividad frente a una gran variedad de patógenos humanos incluyendo bacterias grampositivas, virus, parásitos y hongos (381).

INTRODUCCIÓN

Otros fármacos de la misma familia como el toremifeno y el raloxifeno, presentan actividad *in vitro* frente a *Porphyromonas gingivalis* y atenúan la virulencia de *P. aeruginosa*, respectivamente (382,383).

También, existen varias familias de antihelmínticos, usadas para distintas indicaciones, dentro de las cuales se encuentran las salicilanilidas. Los integrantes principales son la niclosamida, usada para tratar infecciones causadas por cestodos en humanos, y la rafoxanida, oxiclozanida y closantel, más comúnmente usadas en veterinaria para tratar infecciones por trematodos. Se definen como ionoporos de protones, y aunque su mecanismo de acción no se conoce por completo, se cree que consiste en el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa del helminto (384,385). Además de infecciones por parásitos, se está estudiando su actividad en otros campos de la biomedicina como la oncología o el tratamiento de infecciones causadas por bacterias (386). En el caso de las infecciones bacterianas, varios estudios muestran que las salicilanilidas presentan actividad frente a bacterias grampositivas como *S. aureus* o *Clostridium difficile* (387-389) y frente a gramnegativas como *P. aeruginosa* o *Helicobacter pylori* (390,391). Además, recientemente se ha demostrado la sinergia de las salicilanilidas (niclosamida y oxiclozanida) con colistina frente *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y con tobramicina frente a *P. aeruginosa* (392-394).

5.6.1 Artículo 1. *Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections*



Drug Repurposing for the Treatment of Bacterial and Fungal Infections

Andrea Miró-Canturri[†], Rafael Ayerbe-Algaba[†] and Younes Smani*

Clinical Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, Institute of Biomedicine of Seville (IBIS), University Hospital Virgen del Rocío, CSIC, University of Seville, Seville, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Natalia V. Kiriienko,
Rice University, United States

Reviewed by:

Eleftherios Mylonakis,
Alpert Medical School, United States
Giordano Rampioni,
Università degli Studi Roma Tre, Italy
Read Pukkila-Worley,
University of Massachusetts Medical
School, United States

*Correspondence:

Younes Smani
ysmani-ibis@us.es;
y_smani@hotmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 02 October 2018

Accepted: 11 January 2019

Published: 28 January 2019

Citation:

Miró-Canturri A, Ayerbe-Algaba R
and Smani Y (2019) Drug
Repurposing for the Treatment
of Bacterial and Fungal Infections.
Front. Microbiol. 10:41.
doi: 10.3389/fmicb.2019.00041

Multidrug-resistant (MDR) pathogens pose a well-recognized global health threat that demands effective solutions; the situation is deemed a global priority by the World Health Organization and the European Centre for Disease Prevention and Control. Therefore, the development of new antimicrobial therapeutic strategies requires immediate attention to avoid the ten million deaths predicted to occur by 2050 as a result of MDR bacteria. The repurposing of drugs as therapeutic alternatives for infections has recently gained renewed interest. As drugs approved by the United States Food and Drug Administration, information about their pharmacological characteristics in preclinical and clinical trials is available. Therefore, the time and economic costs required to evaluate these drugs for other therapeutic applications, such as the treatment of bacterial and fungal infections, are mitigated. The goal of this review is to provide an overview of the scientific evidence on potential non-antimicrobial drugs targeting bacteria and fungi. In particular, we aim to: (i) list the approved drugs identified in drug screens as potential alternative treatments for infections caused by MDR pathogens; (ii) review their mechanisms of action against bacteria and fungi; and (iii) summarize the outcome of preclinical and clinical trials investigating approved drugs that target these pathogens.

Keywords: repurposing drug, bacteria, fungi, antimicrobial resistance, infection

INTRODUCTION

Bacteria and fungi are highly efficient in acquiring antimicrobial resistance encoded by genomic changes ranging in scale from point mutations, through the assembly of preexisting genetic elements, to the horizontal import of genes from the environment (Kung et al., 2010; Cowen et al., 2015; Yelin and Kishony, 2018). Compounding the problem of antimicrobial resistance is the immediate threat of a reduction in the discovery and development of new antibiotics, the dangers of which have recently been made clear by the World Health Organization (WHO) (Tacconelli et al., 2018) and other European institutions (O'Neill, 2016; Árdal et al., 2018). Consequently, a perfect storm is converging with regard to these infections: increasing antimicrobial resistance with a decreased new drug development (O'Neill, 2016). This context

is likely the best example of the purported “Post-Antibiotic Era,” with relevance even in non-specialized media (Bagley and Outterson, 2017). It is clear that effective solutions are urgently needed as stressed by various institutions.

New policies and actions are necessary to avoid the figures predicted for 2050 that attribute ten million deaths worldwide to antimicrobial resistance (O’Neill, 2016). Such efforts might include: a massive global public awareness campaign; improvements in hygiene and prevention of the spread of infection; increase global surveillance of drug resistance and the appropriate antimicrobial consumption in humans and animals; the promotion of novel rapid diagnostics to curtail the unnecessary use of antimicrobial agents; and the promotion, development, and use of vaccines and other alternatives to both prevent and treat bacterial infections (O’Neill, 2016). Therefore, the development of new antimicrobial therapeutic strategies for use alone or together with one of the scarce but clinically relevant antibiotics has become exigent. In this environment, “repurposing” (defined as investigating new uses for existing drugs) has gained renewed interest, as reflected by several recent studies (Fischbach and Walsh, 2009; Brown, 2015; Rampioni et al., 2017). The combination of these existing drugs with antimicrobial agents currently in clinical use is also under consideration.

A literature review was conducted to search for potential non-antimicrobial candidate drugs that are not intentionally used as antimicrobial agents but have one or more antimicrobial properties. A variety of drug families have been considered including: anthelmintics (Lim et al., 2013; Rajamuthiah et al., 2015; Gooyit and Janda, 2016; Joffe et al., 2017); anticancer drugs (Ueda et al., 2009; Butts et al., 2014; Yeo et al., 2018); anti-inflammatory/immunomodulatory drugs (Artini et al., 2014; Thangamani et al., 2015b; Ogundeji et al., 2016); antipsychotic and antidepressant drugs (Lieberman and Higgins, 2009; Andersson et al., 2016; Holbrook et al., 2017); statins (Parihar et al., 2014; Thangamani et al., 2015a; Ribeiro et al., 2017); and iron-storage drugs (Gi et al., 2014). While these drugs are approved for their clinical indications, promising antibacterial and antifungal activities have been reported in preclinical and clinical studies. It is noteworthy that repurposing drugs is a very promising approach with several advantages. As drugs approved by the Federal Drug Administration (FDA), information about their pharmacological characteristics (both safety and pharmacokinetic) in preclinical and clinical trials is widely available. Therefore, the time and economic costs associated with the repurposing of these drugs for other therapeutic applications such as the treatment of bacterial and fungal infections will be minimized.

In this review, we focus on the current state of knowledge regarding the repurposing of drugs in terms of their modes of action, antimicrobial efficacy and breadth of spectrum against bacteria and fungi, as well as the advances to-date in their development as antimicrobial agents for clinical use. To this end, we introduce in Pubmed database different key words such as repurposing drugs, antibacterial and/or antifungal in order to find published literature about the

repurposing drugs for treatment of bacterial and fungal infections.

POTENTIAL DRUGS FOR REPURPOSING AGAINST INFECTIOUS AGENTS

The antibacterial and antifungal activities of repurposing drugs and their modes of action are summarized in Table 1 and Figure 1.

Anthelmintic Drugs Repurposed Against Bacteria and Fungi

Anthelmintic drugs constitute a large class of medications used for the treatment of helminthiasis. Their activities aside from their use against parasitic infections are being investigated in other areas such as oncology (Dogra et al., 2018; Wang et al., 2018). The activity of these drugs against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and fungi has been reported. The salicylanilide family contains a number of the anthelmintic drugs approved for the treatment of parasitic infections. The most widely used members of this family include niclosamide for humans (Chen et al., 2018) and oxiclozanide, rafoxanide, and closantel for animals (Martin, 1997).

The mode of action of salicylanilides is not completely understood, but they are thought to act as uncouplers of oxidative phosphorylation, thereby impairing the motility of parasites. Rajamuthiah et al. (2015) described the efficacy of niclosamide and oxiclozanide against methicillin-, vancomycin-, linezolid-, or daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. They reported that niclosamide presented bacteriostatic activity whereas oxiclozanide exhibited antibacterial action, likely due to damage in the bacterial membrane. Together with niclosamide and oxiclozanide, other members of the salicylanilides family such as rafoxanide and closantel have presented greater bactericidal activity against the logarithmic and stationary phases of *Clostridium difficile* than vancomycin (Gooyit and Janda, 2016). Avermectins, a broad-spectrum class of anthelmintic drugs which include ivermectin, selamectin, and moxidectin, demonstrated efficacy *in vitro* against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium ulcerans* with minimum inhibitory concentration (MIC) values ranging from 1 to 8 mg/L and 4 to 8 mg/L, respectively (Lim et al., 2013; Omansen et al., 2015). Moreover, ivermectin showed efficacy against *S. aureus* clinical isolates including methicillin-resistant strains (MRSA) (Ashraf et al., 2018). *In vivo*, ivermectin improves LPS-induced survival in mice by reducing serum and murine macrophage levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 and blocking the NF- κ B pathway (Zhang et al., 2008).

In Gram-negative bacteria, only niclosamide exhibited antibacterial activity. This drug showed an anti-virulent effect against *Pseudomonas aeruginosa* via the inhibition of quorum sensing and virulence genes, reducing elastase and pyocyanin levels (Imperi et al., 2013b). In *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*, niclosamide is able to increase the proportion of negative charges on their cell walls, and to potentiate the activity of colistin against colistin-resistant

INTRODUCCIÓN

TABLE 1 | Direct antibacterial and antifungal activity of repurposed drugs.

Drugs	Clinical indication	Target bacteria	Mechanisms of action	Reference
Nicosamide*	Helminthiasis	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibition of quorum sensing and various virulence genes, and reduction of elastase and pyocyanin levels	Imperi et al., 2013b
Oxyclozamide	Helminthiasis	<i>S. aureus</i>	Bacterial membrane damage	Rajamuthiah et al., 2015
Mebendazole	Helminthiasis	<i>C. neoformans</i>	Morphological alterations by reducing capsular dimensions	Joffe et al., 2017
Quinacrine	Helminthiasis	<i>C. albicans</i>	Inhibition of filamentation	Kulkarny et al., 2014
Floxuridine	Colorectal cancer	<i>S. aureus</i>	Inhibition of the SaeRS two-component system, and inhibition of the transcription of other virulence regulatory systems	Yeo et al., 2018
Streptozotocin	Pancreatic islet cell cancer	<i>S. aureus</i>	Inhibition of the SaeRS two-component system, and inhibition of the transcription of other virulence regulatory systems	Yeo et al., 2018
Toremifene	Breast cancer	<i>S. mutans</i> and <i>P. gingivalis</i>	Membrane permeabilization and damage	Gerits et al., 2017
Tamoxifen	Breast cancer	<i>C. neoformans</i>	Binding to the two essential EF-hand proteins calmodulin 1 (Cam1) and calmodulin-like protein (Cml) and prevention of Cam1 from binding to its well-characterized substrate calcineurin	Butts et al., 2014
Raloxifene	Breast cancer	<i>C. neoformans</i>	Binding to the two essential EF-hand proteins calmodulin (Cam1) and calmodulin-like protein (Cml) and prevention of Cam1 from binding to its well-characterized substrate calcineurin	Butts et al., 2014
Clofazimine	Fertility	<i>P. aeruginosa</i>	Binding to FhxB2 which is involved in the production of pyocyanin, a pigment related with the virulence of <i>P. aeruginosa</i>	Ho Sui et al., 2012
Finasteride	Benign prostatic hyperplasia	<i>S. aureus</i>	Inhibition of undecaprenyl diphosphate synthase involved in the synthesis of teichoic acid wall	Farha et al., 2015
5-fluorouracil	Solid tumors	<i>C. albicans</i>	Inhibition of filamentation	Routh et al., 2013
Doxorubicin	Bladder, breast, stomach, lung, ovarian, and thyroid cancers	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibition of biofilm formation and quorum sensing	Ueda et al., 2009
Daunorubicin	Acute myeloid leukemia, acute lymphocytic leukemia, chronic myelogenous leukemia, and Kaposi's sarcoma	<i>C. albicans</i>	Inhibition of filamentation	Chavez-Dozal et al., 2014
Clofazol	Bacterial infection	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibition of the pqs system, probably by targeting the transcriptional regulator PqsR	D'Angelo et al., 2018
Azithromycin	Bacterial infection	<i>P. aeruginosa</i>	Interaction with the ribosome, resulting in direct and/or indirect repression of specific subsets of genes involved in virulence, quorum sensing, biofilm formation,	Imperi et al., 2014
5-fluorocytosine	Fungal infection	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibition of the production of pyoverdine, Ptp protease, and exotoxin A by downregulation of the <i>pvdS</i> gene.	Imperi et al., 2013a
Clotrimazole and iticonazole	Fungal infection	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibition of the <i>pqs</i> activity through the possible inactivation of 2-alkyl-4-quinolones (AQ) production or reception	D'Angelo et al., 2018
Gallium nitrate*	Lymphoma and bladder cancer	<i>P. aeruginosa</i>	Effects on iron metabolism	Antunes et al., 2012
Celecoxib	Inflammation	<i>S. aureus</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>B. subtilis</i> , and <i>M. smegmatis</i>	Inhibition of bacterial DNA, RNA, protein synthesis, and cell wall	Thangamani et al., 2015b
Diflunisal	Inflammation	<i>S. aureus</i>	Inhibition of ArgA, a regulator protein which inhibits alpha-type phenol soluble modulins toxins	Herdrix et al., 2016
Glatiramer acetate	Inflammation	<i>P. aeruginosa</i>	Disruption of biofilm formation	Christiansen et al., 2017

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Drugs	Clinical indication	Target bacteria	Mechanisms of action	Reference
Aspirin and ibuprofen	Inflammation	<i>C. neoformans</i> and <i>C. gattii</i>	Stress induction via activation of the high-osmolality glycerol (HOG) pathway, and activation of reactive oxygen species (ROS)-mediated membrane damage	Ogundiji et al., 2016
Pimozide	Severe Tourette's syndrome and schizophrenia	<i>L. monocytogenes</i>	Reduction of <i>L. monocytogenes</i> internalization by phagocytic cells by decreasing vacuolar escape and diminishing cell-to-cell spread	Lieberman and Higgins, 2009
Azathioprine	Crohn's disease	<i>P. aeruginosa</i> and <i>E. coli</i>	Inhibition of WspR. WspR is a diguanylate cyclase involved in the regulation of a signal molecule called cyclic-di-GMP (c-di-GMP) known as a regulated of the bacterial biofilm formation	Antoniani et al., 2013
Simvastatin	Hypercholesterolemia	<i>M. tuberculosis</i>	Reduction of cholesterol within phagosomal membrane	Parthar et al., 2014
Atorvastatin	Hypercholesterolemia	<i>C. gattii</i>	Reduction of the ergosterol content in the cell membrane and alteration of the properties of the polysaccharide capsule; increase in the production of ROS by macrophages; and reduction of yeast phagocytosis and the intracellular proliferation rate	Ribeiro et al., 2017
Ebselen*	Bipolar disorder and ischemic stroke	<i>S. aureus</i> , <i>C. difficile</i>	Reduction of biofilm formation and targeting of the glucosyltransferase domain toxins	Gi et al., 2014; Peng et al., 2018
Pentetic acid	Hypocalcemia	<i>P. aeruginosa</i>	Reduction of biofilm formation and inhibition of elastase	Gi et al., 2014
Auranofin	Rheumatoid arthritis	<i>S. aureus</i>	DNA inhibition and protein synthesis, and downregulation of toxin production	Thangamani et al., 2016a

* Some of the drugs listed in this table displayed multiple effects against different pathogens, and that only the findings of an exemplifying study are reported in the table. Other studies on the same drugs are discussed in the text.

A. baumannii and *K. pneumoniae* (Ayerbe-Algaba et al., 2018). Recently, the effectiveness of niclosamide against *Helicobacter pylori* has been described, showing an MIC of 0.25 mg/L against the ATCC 49503 strain (Tharmalingam et al., 2018). Furthermore, niclosamide has demonstrated an immunomodulatory role by decreasing the secretion of IL-8 in a gastric cancer cell line after *H. pylori* infection (Tharmalingam et al., 2018). Niclosamide also showed therapeutic efficacy in an experimental infection model of *Galleria mellonella* larvae infected with *P. aeruginosa* and *H. pylori* (Imperi et al., 2013b; Tharmalingam et al., 2018). The formulation of niclosamide under nanosuspension showed lower toxicity in a rat lung infection model involving *P. aeruginosa*; the results of this study are potentially favorable for the further study of this formulation (Costabile et al., 2015).

In the case of fungi, mebendazole inhibited the growth of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* and affected the formation of biofilm by *C. neoformans* (Joffe et al., 2017). The combination of mebendazole with amphotericin B increased the fungicidal activity of amphotericin B against *C. neoformans* twofold (Joffe et al., 2017). Moreover, quinacrine, in monotherapy, has been shown *in vitro* to be effective for the prevention and treatment of *Candida albicans* biofilms, accumulating in vacuoles and causing defects in endocytosis (Kulkarny et al., 2014). In combination with caspofungin or amphotericin B, quinacrine has demonstrated synergy against *C. albicans* (Kulkarny et al., 2014).

These studies highlight the potential use of the anthelmintic drugs as antimicrobial agents as monotherapy for infections caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi; although *in vivo* studies in vertebrate experimental models should be conducted.

Anticancer Drugs Repurposed Against Bacteria and Fungi

The antibacterial activity of anticancer drugs has also been reported (Soo et al., 2017). Most of them act against Gram-positive pathogens.

The FDA-approved anticancer drugs floxuridine (mostly used in colorectal cancer) and streptozotocin (used for pancreatic islet cell cancer) have exhibited activity against *S. aureus* by inhibiting the SaeRS two-component system (TCS) (Yeo et al., 2018). SaeRS TCS is an important transcriptional regulator of different virulence factors of *S. aureus* including adhesins, toxins, and enzymes (Yeo et al., 2018). Floxuridine showed direct antibacterial activity by inhibiting the growth of *S. aureus* USA300 at a concentration of 0.0625 mg/L *in vitro* and increasing the survival of mice by 60% in a murine model of blood infection *in vivo* (Yeo et al., 2018). On the other hand, streptozotocin did not affect staphylococcal growth *in vitro* but reduced the mortality of mice to 10% *in vivo* (Yeo et al., 2018). Both drugs not only cause significant changes in the transcription of *S. aureus* genes, but also inhibit the transcription of other virulence regulatory systems of *S. aureus* (Yeo et al., 2018).

Another group of anticancer drugs developed to combat breast cancer is the selective estrogen receptor modulators

TABLE 1 | Continued

Drugs	Clinical indication	Target bacteria	Mechanisms of action	Reference
Aspirin and ibuprofen	Inflammation	<i>C. neoformans</i> and <i>C. gattii</i>	Stress induction via activation of the high-osmolality glycerol (HOG) pathway, and activation of reactive oxygen species (ROS)-mediated membrane damage	Ogundiji et al., 2016
Primozone	Severe Tourette's syndrome and schizophrenia	<i>L. monocytogenes</i>	Reduction of <i>L. monocytogenes</i> internalization by phagocytic cells by decreasing vacuolar escape and diminishing cell-to-cell spread	Lieberman and Higgins, 2009
Azathioprine	Crohn's disease	<i>P. aeruginosa</i> and <i>E. coli</i>	Inhibition of WspR. WspR is a diguanylate cyclase involved in the regulation of a signal molecule called cyclic-di-GMP (c-di-GMP) known as a regulated of the bacterial biofilm formation	Antoniani et al., 2013
Simvastatin	Hypercholesterolemia	<i>M. tuberculosis</i>	Reduction of cholesterol within phagosomal membrane	Parthar et al., 2014
Atorvastatin	Hypercholesterolemia	<i>C. gattii</i>	Reduction of the ergosterol content in the cell membrane and alteration of the properties of the polysaccharide capsule; increase in the production of ROS by macrophages; and reduction of yeast phagocytosis and the intracellular proliferation rate	Ribeiro et al., 2017
Ebselen*	Bipolar disorder and ischemic stroke	<i>S. aureus</i> , <i>C. difficile</i>	Reduction of biofilm formation and targeting of the glucosyltransferase domain toxins	Gi et al., 2014; Peng et al., 2018
Pentetic acid	Hypocalcemia	<i>P. aeruginosa</i>	Reduction of biofilm formation and inhibition of elastase	Gi et al., 2014
Auranofin	Rheumatoid arthritis	<i>S. aureus</i>	DNA inhibition and protein synthesis, and downregulation of toxin production	Thangamani et al., 2016a

* Some of the drugs listed in this table displayed multiple effects against different pathogens, and that only the findings of an exemplifying study are reported in the table. Other studies on the same drugs are discussed in the text.

A. baumannii and *K. pneumoniae* (Ayerbe-Algaba et al., 2018). Recently, the effectiveness of niclosamide against *Helicobacter pylori* has been described, showing an MIC of 0.25 mg/L against the ATCC 49503 strain (Tharmalingam et al., 2018). Furthermore, niclosamide has demonstrated an immunomodulatory role by decreasing the secretion of IL-8 in a gastric cancer cell line after *H. pylori* infection (Tharmalingam et al., 2018). Niclosamide also showed therapeutic efficacy in an experimental infection model of *Galleria mellonella* larvae infected with *P. aeruginosa* and *H. pylori* (Imperi et al., 2013b; Tharmalingam et al., 2018). The formulation of niclosamide under nanosuspension showed lower toxicity in a rat lung infection model involving *P. aeruginosa*; the results of this study are potentially favorable for the further study of this formulation (Costabile et al., 2015).

In the case of fungi, mebendazole inhibited the growth of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* and affected the formation of biofilm by *C. neoformans* (Joffe et al., 2017). The combination of mebendazole with amphotericin B increased the fungicidal activity of amphotericin B against *C. neoformans* twofold (Joffe et al., 2017). Moreover, quinacrine, in monotherapy, has been shown *in vitro* to be effective for the prevention and treatment of *Candida albicans* biofilms, accumulating in vacuoles and causing defects in endocytosis (Kulkarny et al., 2014). In combination with caspofungin or amphotericin B, quinacrine has demonstrated synergy against *C. albicans* (Kulkarny et al., 2014).

These studies highlight the potential use of the anthelmintic drugs as antimicrobial agents as monotherapy for infections caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi; although *in vivo* studies in vertebrate experimental models should be conducted.

Anticancer Drugs Repurposed Against Bacteria and Fungi

The antibacterial activity of anticancer drugs has also been reported (Soo et al., 2017). Most of them act against Gram-positive pathogens.

The FDA-approved anticancer drugs floxuridine (mostly used in colorectal cancer) and streptozotocin (used for pancreatic islet cell cancer) have exhibited activity against *S. aureus* by inhibiting the SaeRS two-component system (TCS) (Yeo et al., 2018). SaeRS TCS is an important transcriptional regulator of different virulence factors of *S. aureus* including adhesins, toxins, and enzymes (Yeo et al., 2018). Floxuridine showed direct antibacterial activity by inhibiting the growth of *S. aureus* USA300 at a concentration of 0.0625 mg/L *in vitro* and increasing the survival of mice by 60% in a murine model of blood infection *in vivo* (Yeo et al., 2018). On the other hand, streptozotocin did not affect staphylococcal growth *in vitro* but reduced the mortality of mice to 10% *in vivo* (Yeo et al., 2018). Both drugs not only cause significant changes in the transcription of *S. aureus* genes, but also inhibit the transcription of other virulence regulatory systems of *S. aureus* (Yeo et al., 2018).

Another group of anticancer drugs developed to combat breast cancer is the selective estrogen receptor modulators

INTRODUCCIÓN

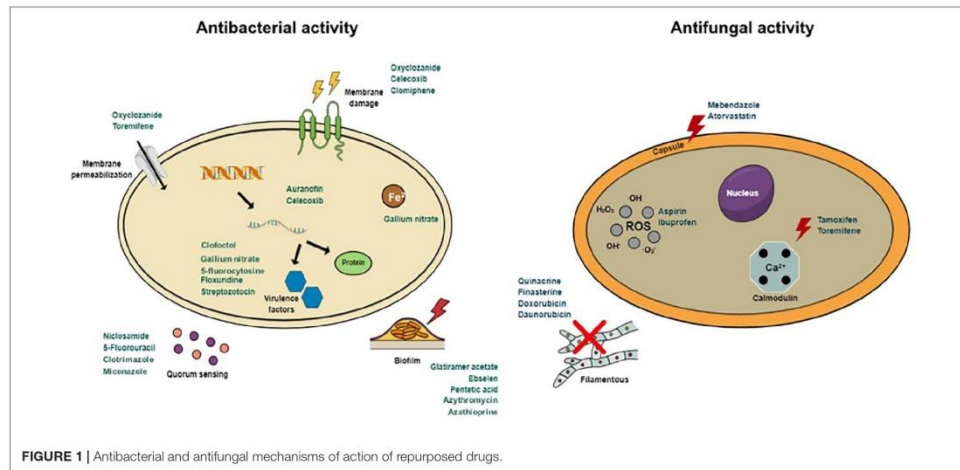


FIGURE 1 | Antibacterial and antifungal mechanisms of action of repurposed drugs.

(SERMs). Tamoxifen has been reported to exhibit activity against *S. aureus* (Corriden et al., 2015) and its analog toremifene showed efficacy against oral infection caused by *Streptococcus mutans* (Gerits et al., 2017). Toremifene also has been shown to reduce biofilm formation by *S. mutans* due to a possible increase in membrane permeabilization and therefore, membrane damage (Gerits et al., 2017). Clomiphene, another SERM in preclinical development for the treatment of fertility, has demonstrated efficacy against *S. aureus* and *Bacillus subtilis* *in vitro*, with an MIC value of 8 mg/L, and incubation of *B. subtilis* with this concentration of clomiphene changed its morphology (Farha et al., 2015). The mode of action of clomiphene is through the inhibition of undecaprenyl diphosphate synthase (UPPS), an enzyme involved in the synthesis of the teichoic acid wall of *S. aureus* (Farha et al., 2015). Due to this action on the bacterial wall, clomiphene exhibits synergy with β -lactams in restoring MRSA susceptibility (Farha et al., 2015).

Other anticancer drugs were tested as adjunctive therapies against *M. tuberculosis* infection. One such drug, denileukin diftitox, is currently used for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma (Gupta et al., 2017). Treatment with denileukin diftitox slightly reduced the lung bacterial count in mice aerosol-infected with *M. tuberculosis* (Gupta et al., 2017). The addition of this drug to standard tuberculosis treatments, composed of rifampin, isoniazid, and pyrazinamide, similarly reduced the bacterial burden (Gupta et al., 2017).

Different studies have been also performed on Gram-negative bacteria to evaluate the antibacterial effect of anticancer drugs. A potent anticancer drug indicated for the treatment of different types of solid tumors called 5-fluorouracil, as well as gallium nitrate, an anticancer drug for the treatment of lymphoma and bladder cancer, have been extensively studied (Banin et al., 2008; Bonchi et al., 2014; Minandri et al., 2014; Rangel-Vega et al.,

2015). 5-fluorouracil has been used against a collection of 5,850 mutants of the *P. aeruginosa* PA14 strain, revealing positive activity via the regulation of a large number of genes involved in quorum sensing and biofilm formation (Ueda et al., 2009; Rangel-Vega et al., 2015). Also, gallium nitrate has demonstrated *in vitro* an inhibitory effect on bacterial growth in a collection of 58 multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* strains, and in *P. aeruginosa* at concentrations $>3.13 \mu\text{M}$ (Kaneko et al., 2007; Antunes et al., 2012; Frangipani et al., 2014); although the presence of pyoverdine and proteases in human serum reduce the efficacy of gallium nitrate against *P. aeruginosa* by increasing its MIC (Bonchi et al., 2015). At non-bactericidal concentrations, gallium nitrate can affect the production of virulence factors of *P. aeruginosa* (Kaneko et al., 2007; García-Contreras et al., 2014). In *G. mellonella*, the administration of this drug alone or in combination with colistin, at concentrations mimicking the human therapeutic dose of gallium nitrate used for cancer patients (28 μM), significantly increased the survival of larvae after infection by *A. baumannii* (Antunes et al., 2012). Moreover, in murine models of acute and chronic lung infections by *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, gallium nitrate has reduced lung injury and bacterial loads in tissues (Kaneko et al., 2007; de Léséleuc et al., 2012). Regarding SERM drugs, toremifene has shown efficacy against oral infection caused by *Porphyromonas gingivalis* (Gerits et al., 2017), and raloxifene attenuated *in vitro* and in *Caenorhabditis elegans* model the virulence of *P. aeruginosa* by binding to PhzB2 which is involved in the production of pyocyanin, a pigment related with the virulence of this pathogen (Ho Sui et al., 2012).

In the case of fungi, the activity of anticancer drugs has also been investigated. Floxuridine, at twice its half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value, has exhibited fungicidal

activity against *Exserohilum rostratum* reducing the hyphae-derived CFU (colony-forming unit) of this fungus (Sun et al., 2013). The SERM compounds such as tamoxifen and toremifene have also shown fungicidal activity against *C. neoformans*. They also display a number of pharmacological properties desirable for anticryptococcal drugs, including synergistic fungicidal activity with fluconazole and/or amphotericin B *in vitro* and *in vivo*, oral bioavailability, and activity within macrophages (Butts et al., 2014). They bind directly to the two essential EF-hand proteins calmodulin 1 (Cam1) and calmodulin-like protein 1 (Cml1) of *C. neoformans*, preventing Cam1 from binding to its well-characterized substrate calcineurin (Cna1), thereby blocking Cna1 activation (Butts et al., 2014). In whole cells, toremifene and tamoxifen are known to block the calcineurin-dependent nuclear localization of the transcription factor Crz1 (Butts et al., 2014). Together, both drugs have inhibited the growth of *C. neoformans* within macrophages, a niche not accessible to current antifungal drugs (Butts et al., 2014). In murine-disseminated cryptococcosis, tamoxifen in combination with fluconazole decreased the brain burden by $\sim 1 \log_{10}$ CFU/g (Butts et al., 2014). Against *C. albicans* and *Candida glabrata*, toremifene has enhanced the antibiofilm activity of amphotericin B and caspofungin [fractional inhibitory concentration index (FICI) < 0.5 both *in vitro* and *in vivo* worm infection models (Delattin et al., 2014)].

Other anticancer drug such as finasteride, a 5- α -reductase inhibitor commonly used for the treatment of benign prostatic hyperplasia, was highly effective in both the prevention and destruction of *C. albicans* biofilm formation at doses greater than 16 and 128 mg/L, respectively (Chavez-Dozal et al., 2014). In combination with 2 mg/L fluconazole, 2 mg/L finasteride exhibited synergistic activity in the prevention of biofilm formation by *C. albicans* (Chavez-Dozal et al., 2014). Similar effects were observed in the presence of doxorubicin and daunorubicin that inhibited the morphogenesis of *C. albicans* (Routh et al., 2013).

Anticancer drugs not only target bacteria and fungi but can also regulate the host response. Floxuridine and streptozotocin have presented a protective effect on the host by reducing *S. aureus*-mediated killing in human neutrophils (Yeo et al., 2018). Moreover, tamoxifen can stimulate chemotaxis, phagocytosis, and neutrophil extracellular trap (NET) formation through the modulation of the ceramide pathway upon infection with *S. aureus* (Corriden et al., 2015). Unlike tamoxifen, its analog raloxifene has been shown to reduce NET formation in human neutrophils, thus resulting in cell death of *S. aureus* (Flores et al., 2016). In addition, denileukin difitox has been reported to bind to the IL-2 receptor in T lymphocytes, thereby introducing diphtheria toxin inside these cells to suppress them. The decrease in this type of T cell hinders the replication of *M. tuberculosis* (Gupta et al., 2017). It is noteworthy to mention that toxicity of anticancer drugs is important in terms of their establishment as antibacterial drugs. Tamoxifen has been used for over 30 years to treat breast cancer. The doses of tamoxifen used in animals (250 mg/kg) (Corriden et al., 2015) and in humans (20–40 mg) are generally tolerated. For clomiphene, acute oral LD₅₀ in mice and rats were 1,700 and 5,750 mg/kg, respectively (Drug Bank, 2018). The toxic dose of clomiphene

in humans is unknown but toxic effects accompanying acute overdosage were not observed (Drug Bank, 2018). In the case of gallium nitrate, the treatment of hypercalcemia was performed with continuous intravenous infusion (200 mg/m²/day during 5 days) being generally well tolerated (Warrell et al., 1988). On the other hand, higher doses (300 mg/m²/day during 5–7 days) were used in cancer and side effects such as diarrhea and renal toxicity were observed (Chitambar, 2010).

Anti-inflammatory and Immunomodulatory Drugs Repurposed Against Bacteria and Fungi

As is the case with anticancer drugs, anti-inflammatory and immunomodulatory drugs have demonstrated more antibacterial activity against Gram-positive than Gram-negative bacteria and fungi.

Celecoxib, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), showed antibacterial activity against several pathogens including *S. aureus*, *Bacillus anthracis*, *B. subtilis*, and *M. smegmatis* (Thangamani et al., 2015b). Celecoxib has demonstrated non-specific targeting by inhibiting bacterial DNA and RNA replication, protein synthesis, and cell wall formation (Thangamani et al., 2015b), as well as reducing the levels of IL-6, TNF- α , IL-1 β , and MCP-1 (monocyte-chemoattractant protein-1) in skin lesions caused by *S. aureus* infection (Thangamani et al., 2015b). Moreover, this drug has exhibited synergy with several topical and systemic antimicrobials used against *S. aureus*, with the exception of linezolid (Thangamani et al., 2015b).

Other NSAIDs, such diflunisal in combination with diclofenac, ibuprofen and verapamil have shown antibacterial activity against *S. aureus* and *M. tuberculosis* (Dutta et al., 2007; Vilaplana et al., 2013; Gupta et al., 2015; Hendrix et al., 2016). It was reported that diflunisal did not affect the bacterial growth of *S. aureus in vitro*, but did inhibit their toxicity in murine and human osteoblasts *in vivo* (Hendrix et al., 2016). Confirmed data have been observed in mice treated with diflunisal, which have presented less cortical bone marrow destruction, although a reduction in the bacterial load was not observed (Hendrix et al., 2016). Even though bacterial growth was not compromised, diflunisal inhibited accessory gene regulator A (Agra), a regulator protein which inhibits alpha-type phenol soluble modulins (PSMs) and may contribute to a reduction in *S. aureus* virulence (Hendrix et al., 2016). In the case of verapamil, it has potentiated the activity of bedaquiline, a novel drug used to treat MDR tuberculosis, against *M. tuberculosis* (Dutta et al., 2007; Gupta et al., 2015). Moreover, treatment with ibuprofen significantly decreased the bacterial load and increased mice survival in an experimental model of active tuberculosis (Vilaplana et al., 2013).

For Gram-negative bacteria, celecoxib and betamethasone in combination with antibiotics have demonstrated activity against different bacterial species (Artini et al., 2014; Thangamani et al., 2015b). Celecoxib has presented synergy with colistin against *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* and *Salmonella enterica* serovar

Typhimurium (Thangamani et al., 2015b), and betamethasone has demonstrated synergy with ceftazidime, erythromycin, and ofloxacin against *P. aeruginosa* and some strains of *E. coli* (Artini et al., 2014). Diclofenac, in turn, was found to exhibit efficacy both *in vitro* and *in vivo* against *S. enterica* serovar Typhimurium (Dutta et al., 2007). In the case of glatiramer acetate, a drug used in the treatment of multiple sclerosis, activity against *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, and *E. coli* reference strains, and against *A. baumannii* and *P. aeruginosa* clinical isolates from bacteremia and chronic respiratory infections in cystic fibrosis patients has been observed by disruption of the biofilm formation (Christiansen et al., 2017).

Like anticancer drugs, some anti-inflammatory and immunosuppressive drugs such as aspirin, ibuprofen, and tacrolimus have shown antifungal activity against *C. neoformans*, *C. gattii*, and *E. rostratum*, respectively (Sun et al., 2013; Ogundeji et al., 2016). The treatment of cryptococcal cells with aspirin and ibuprofen has led to the induction of stress via activation of the high-osmolarity glycerol (HOG) pathway in *C. neoformans* and *C. gattii*, and to their death through the activation of reactive oxygen species (ROS)-mediated membrane damage (Ogundeji et al., 2016). The MICs of these drugs did not negatively affect growth or impair macrophage function; rather, they enhanced the ability of these immune cells to phagocytose cryptococcal cells (Ogundeji et al., 2016). Moreover, treatment with tacrolimus at twice its IC₅₀ value significantly reduced the hyphae-derived CFU of *E. rostratum* (Sun et al., 2013).

Antipsychotic and Antidepressant Drugs Repurposed Against Bacteria and Fungi

Trifluoperazine, an antipsychotic drug, has showed therapeutic efficacy in a murine model of *C. difficile* infection, presenting higher survival rates than those treated with vancomycin; a decrease in inflammation and edema was also observed compared with the infected group (Andersson et al., 2016). Furthermore, together with amoxapine, trifluoperazine in combination with vancomycin protected 80% and 100% of mice, respectively, from severe oral infection caused by *C. difficile* (Andersson et al., 2016). Rani Basu et al. (2005) reported that the combination of two different non-antimicrobial drugs, prochlorperazine and methdilazine, may present antibacterial activity against *S. aureus*.

For Gram-negative bacteria, pimozide, used for the treatment of severe Tourette's syndrome and schizophrenia, has reduced *in vitro* the internalization of *S. enterica* serovar Typhimurium and *E. coli* by phagocytic cells (Lieberman and Higgins, 2009). Moreover, pimozide reduced the bacterial uptake and vacuolar escape of *Listeria monocytogenes* in bone marrow-derived macrophages, as well as the invasion and cell-to-cell spread of the bacteria during the infection of non-phagocytic cells (Lieberman and Higgins, 2009). In addition, the drugs trifluoperazine and amoxapine were shown to be active against *Yersinia pestis* after screening of a library of 780 FDA-approved drugs to identify molecules which reduce *Y. pestis* cytotoxicity in murine macrophages (Andersson et al., 2016). These two compounds exhibited therapeutic efficacy in a murine model of pneumonic

plague by *Y. pestis*; although the treatment was less effective when administration of the drug was delayed (Andersson et al., 2017). However, their efficacy was improved when both compounds were administered in combination with levofloxacin (Andersson et al., 2017). In addition to this study, amoxapine was reported to present therapeutic efficacy in an experimental murine model of respiratory infection caused by *K. pneumoniae* (Andersson et al., 2017). Finally, azathioprine, an antidepressant drug used for the treatment of Crohn's disease, has exhibited anti-biofilm activity against *P. aeruginosa* and *E. coli* through the inhibition of WspR (Antoniani et al., 2013). WspR is a diguanylate cyclase involved in the regulation of a signal molecule called cyclic-di-GMP (c-di-GMP) known as a regulator of the bacterial biofilm formation (Antoniani et al., 2013).

In the case of fungi, the antipsychotic drug bromperidol has exhibited synergy with various azoles against *C. albicans*, *C. glabrata*, and *Aspergillus terreus* (Holbrook et al., 2017). Bromperidol has demonstrated synergy with posaconazole and voriconazole, and partial synergy with itraconazole and ketoconazole against *C. albicans*, *C. glabrata*, and *A. terreus*, as demonstrated by checkerboard and time-kill assays (Holbrook et al., 2017). Moreover, bromperidol in combination with posaconazole and voriconazole, increased the disruption of biofilm formation by sessile cells of *C. albicans* induced by both azoles. Their sessile MICs were reduced from >32 to 0.5 mg/L (Holbrook et al., 2017).

Other Drugs Repurposed Against Bacteria and Fungi

Other drugs with different modes of action and clinical indications have been evaluated as antibacterial agents. Auranofin, which is used for the treatment of rheumatoid arthritis, has shown in monotherapy greater activity against a wide range of Gram-positive bacteria including *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, and *Streptococcus agalactiae* when compared with vancomycin or linezolid (Aguinagalde et al., 2015; Thangamani et al., 2016a,b). *In vivo*, auranofin and its analogs have demonstrated therapeutic efficacy in different experimental models such as MRSA septicemic infection, MRSA skin infection, MRSA implant infection model (a model involving mesh-associated biofilm), and MRSA intramuscular infection model (Aguinagalde et al., 2015; Thangamani et al., 2016a,b). Interestingly, auranofin has demonstrated synergy with the commonly used antibiotics such as ciprofloxacin, linezolid, and gentamicin against MRSA (Thangamani et al., 2016b). In order to improve the activity of auranofin, different analogs were synthesized and display improved antibacterial activity against *S. aureus* and *S. pneumoniae* causing bacteremia in murine model (Aguinagalde et al., 2015). The mode of action of auranofin against *S. aureus* has been deciphered using the macromolecular biosynthesis assay which showed that auranofin acts on the inhibition of DNA replication and protein synthesis, downregulating the toxin production (Thangamani et al., 2016a).

Ebselen; despite the fact that it is not an FDA-approved drug, it is being investigated in clinical trials for the treatment of

bipolar disorder and ischemic stroke, has also been evaluated. Two studies have suggested that this compound exhibited antibacterial activity against *C. difficile* *in vitro* and *in vivo* by targeting glucosyltransferase domain (GTD) of *C. difficile* toxins (Peng et al., 2018), and against MRSA and vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) with MIC values <1 mg/L (Thangamani et al., 2015c). Moreover, ebselen has also reduced the biofilm formation by *S. aureus* (Gi et al., 2014). Synergy between this drug and fusidic acid, retapamulin, mupirocin, and daptomycin against *S. aureus* strains was confirmed using a Bliss model (Thangamani et al., 2015c).

Besides these two drugs, the antihistaminic compounds terfenadine and its analogs were also investigated as potential antibacterial drugs. Terfenadine has showed reasonable activity against *S. aureus* (Perlmutter et al., 2014). In order to improve their activity, 84 derivatives were synthesized that have presented greater MIC values against *S. aureus* (1 mg/L) as well as activity against *E. faecium*, *E. faecalis*, and *M. tuberculosis* (Perlmutter et al., 2014).

In the case of statins, simvastatin, used in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease and hypercholesterolemia, has exhibited antibacterial activity in monotherapy against *M. tuberculosis* (Parihar et al., 2014; Skerry et al., 2014). It marginally reduced the bacterial load 4 and 8 weeks after infection with *M. tuberculosis* by aerosol exposure; presumably by reducing cholesterol synthesis due to the inhibition of HMG-CoA reductase within the phagosomal membrane. This process has consequently enhanced the maturation of phagosomes, known to provide better defense against *M. tuberculosis*, and by inducing the autophagy of *M. tuberculosis*-infected macrophages (Parihar et al., 2014). The addition of simvastatin to the first-line tuberculosis therapy (rifampicin + isoniazid + pyrazinamide) may help to reduce mycobacterial infection and tissue damage in *M. tuberculosis*-infected mice (Skerry et al., 2014). Similarly, atorvastatin, another statin drug, has also demonstrated synergistic activity with rifampin *in vitro* against *M. tuberculosis* and in a murine model of *Mycobacterium leprae* infection (Lobato et al., 2014).

Regarding Gram-negative bacteria, auranofin exhibited synergy with polymyxin B against *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *S. enterica* serovar Typhimurium (Thangamani et al., 2016a).

Ebselen has also presented antibacterial effect against *A. baumannii* and *E. coli* by reducing their bacterial growth at MICs of 32 μ M and <128 μ M, respectively. This bacterial reduction growth was due to the inhibition of TonB-mediated physiology, which is involved in iron acquisition from host sources (Nairn et al., 2017). Furthermore, ebselen exhibited anti-virulence activity against *P. aeruginosa* by targeting c-di-GMP signaling pathway, which regulates motility and biofilm formation (Gi et al., 2014; Lieberman et al., 2014).

In the case of statins, the combination of simvastatin with sub-inhibitory concentrations of colistin presented synergistic effect against a collection of *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *S. enterica* serovar Typhimurium reducing the MIC of simvastatin from >256 mg/L to a range between 8 and 32 mg/L (Thangamani et al., 2015a). In addition, screening of an

FDA-approved drug library has identified pentetic acid, an iron chelator, as an inhibitor of elastase, an important exoprotease as well as a reducer of biofilm formation by *P. aeruginosa* (Gi et al., 2014). When applied to *P. aeruginosa* infections in human lung tissue, pentetic acid increased the viability of human lung epithelial A549 cells post-infection (Gi et al., 2014). Interestingly, pentetic acid has also demonstrated therapeutic efficacy in a murine experimental model of respiratory infection by *P. aeruginosa* by increasing 42% the mice survival 5 days post-infection (Gi et al., 2014).

Moreover, calcitriol, a bioactive form of vitamin D3 used to treat hypocalcemic conditions and renal osteodystrophy, has been described as an enhancer of bactericidal activity against *P. aeruginosa*, due to its capacity to modulate the activity of monocytes and macrophages by increasing their bacterial killing (Nouari et al., 2015).

Other drugs that have presented anti-virulence effect against *P. aeruginosa* have been reported. For example 5-fluorocytosine, an antifungal drug, has been shown to reduce *in vitro* the production of virulence factors by *P. aeruginosa* such as pyoverdine, PrpL protease, and exotoxin A by downregulating *pvdS* gene expression (Imperi et al., 2013a), and to suppress *in vivo* the pathogenicity of *P. aeruginosa* in a murine model of lung infection (Imperi et al., 2013a). Other antifungal drugs such as clotrimazole and miconazole were identified as inhibitors of 2-heptyl-3-hydroxy-4 quinolone (PQS) quorum sensing (QS) system. This system is based on signal 2-alkyl-4-quinolones (AQ): PQS and 2-heptyl-4-hydroxyquinolone (HHQ) which can bind and activate the regulator PqsR and controls the expression of *P. aeruginosa* virulence factors. D'Angelo et al. (2018) have shown that probably both drugs modify PqsR function by competing with PQS and HHQ for the PqsR ligand-binding site. Finally, clofocetol and azithromycin, drugs originally developed as antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively, were found to have also anti-virulence properties against *P. aeruginosa* (Imperi et al., 2014; D'Angelo et al., 2018).

In the case of fungi, atorvastatin has demonstrated different effects on the host and the yeast by: (i) reducing the ergosterol content in the cell membrane and altering the properties of the polysaccharide capsule of *C. gattii*; (ii) increasing the production of ROS by macrophages; and (iii) reducing yeast phagocytosis and the intracellular proliferation rate (Ribeiro et al., 2017). Atorvastatin in combination with fluconazole was also tested as an adjuvant to control fungal infections. This combination demonstrated synergy *in vitro* against one strain of *C. gattii*. *In vivo*, atorvastatin plus fluconazole increased the survival of mice and reduced the burden of *C. gattii* in the lungs and brain (Ribeiro et al., 2017). Moreover, preclinical antimalarial drugs such as MMV665943 have been shown to inhibit and delay growth at submicromolar concentrations and exhibit fungicidal activity at concentrations greater than 1.56 μ M against *C. albicans*, *C. neoformans*, *C. gattii* and *Lomentospora prolificans*. More specifically, this compound at concentrations greater than 1.56 μ M affects the polysaccharide capsule thickness of *C. neoformans* (Jung et al., 2018).

Regarding the immune response modulation, ebselen and auranofin reduced the production of inflammatory cytokines

such as TNF- α , IL-6, IL-1 β , and MCP-1 in skin lesions infected by *S. aureus* (Thangamani et al., 2016a, 2015c). Similarly, calcitriol has shown a modulatory effect on monocytes and macrophages against *P. aeruginosa* infection by increasing their bacterial killing (Nouari et al., 2015). The mechanism of action of calcitriol on the immune system is unknown; although its downregulating effect on IL-1 β , IL-6, and IL-8 has been observed (Xue et al., 2002). In the case of statin, simvastatin has been reported to modulate the production of proinflammatory cytokines (IL-8 and CCL20) and Kruppel-like factors (an emerging group of immune system regulators) in *P. aeruginosa* respiratory infections (Hennessy et al., 2014).

CLINICAL APPLICATION OF REPURPOSED DRUGS AGAINST INFECTIOUS AGENTS

Even though repurposed drugs showed promising preclinical data, to our knowledge only three clinical studies have been performed or are currently underway.

A randomized study on the role of aspirin in tuberculous meningitis suggested that aspirin in combination with corticosteroids reduced the incidence of strokes and mortality (Misra et al., 2010). A similar study on the role of aspirin as an adjunct with steroids for the treatment of HIV-negative adults with tuberculous meningitis in Vietnam is still ongoing, now in Phase II trial (clinical trials identifier: NCT02237365). Another Phase III trial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02060006) is being conducted to evaluate the feasibility and efficacy of using meloxicam, a cheap and widely available NSAID, as a preventive intervention for tuberculous-immune reconstituted inflammatory syndrome; results from this study have yet to be published (Maitra et al., 2016).

REFERENCES

- Aguinalde, L., Diez-Martinez, R., Yuste, J., Royo, I., Gil, C., Lasa, I., et al. (2015). Auranofoin efficacy against MDR *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2608–2617. doi: 10.1093/jac/dkv163
- Andersson, J. A., Fitts, E. C., Kirtley, M. L., Ponnusamy, D., Peniche, A. G., Dann, S. M., et al. (2016). New role for FDA-approved drugs in combating antibiotic-resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 3717–3729. doi: 10.1128/AAC.00326-16
- Andersson, J. A., Sha, J., Kirtley, M. L., Reyes, E., Fitts, E. C., Dann, S. M., et al. (2017). Combating multidrug-resistant pathogens with host-directed nonantibiotic therapeutics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e1943–e1917. doi: 10.1128/AAC.01943-17
- Antoniani, D., Rossi, E., Rinaldo, S., Bocci, P., Lolicato, M., Paiardini, A., et al. (2013). The immunosuppressive drug azathioprine inhibits biosynthesis of the bacterial signal molecule cyclic-di-GMP by interfering with intracellular nucleotide pool availability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7325–7336. doi: 10.1007/s00253-013-4875-0
- Antunes, L. C. S., Imperi, F., Minandri, F., and Visca, P. (2012). In vitro and in vivo antimicrobial activities of gallium nitrate against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5961–5970. doi: 10.1128/AAC.01519-12
- Árdal, C., Baraldi, E., Theuretzbacher, U., Outtersson, K., Plahte, J., Ciabuschi, F., et al. (2018). Insights into early stage of antibiotic development in small- and medium-sized enterprises: a survey of targets, costs, and durations. *J. Pharm. Policy Pract.* 11:8. doi: 10.1186/s40545-018-0135-0
- Artini, M., Cellini, R., Tilota, A., Barbato, M., Koverech, A., Selan, L., et al. (2014). Effect of betamethasone in combination with antibiotics on gram positive and gram negative bacteria. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 27, 675–682. doi: 10.1177/039463201402700426
- Ashraf, S., Chaudhry, U., Raza, A., Ghosh, D., and Zhao, X. (2018). In vitro activity of ivermectin against *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 7:27. doi: 10.1186/s13756-018-0314-4
- Ayerbe-Algaba, R., Gil-Marqués, M. L., Jiménez-Mejías, M. E., Sánchez-Encinales, V., Parra-Millán, R., Pachón Ibáñez, M. E., et al. (2018). Synergistic activity of nicosamide in combination with colistin against colistin-susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:348. doi: 10.3389/fcimb.2018.00348
- Bagley, N., and Outtersson, K. (2017). *We Will Miss Antibiotics When They're Gone* Available at: www.nytimes.com/2017/01/18/opinion/how-to-avoid-a-post-antibiotic-world.html
- Banin, E., Lozinski, A., Brady, K. M., Berenshtein, E., Butterfield, P. W., Moshe, M., et al. (2008). The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 16761–16766. doi: 10.1073/pnas.0808608105
- Bonchi, C., Frangipani, E., Imperi, F., and Visca, P. (2015). Pyoverdine and proteases affect the response of *Pseudomonas aeruginosa* to gallium in human

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

In the last decade, substantial progress has been made in the development of repurposed drugs for the treatment of bacterial and fungal infections. Several compounds have yielded promising data but developmental efforts remain in the preclinical stage. Additional relevant issues should be taken into account in the preclinical development of repurposing drugs including possible need for new formulations to increase their bioavailability and ADMET tests if the administration route is changed, possible negative effect of the primary drug activity (especially for anticancer and antipsychotic drugs), and challenges for intellectual property rights. Moreover, further clinical studies are needed to address the urgent demand for new treatments targeting infections caused by bacteria and fungi.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM-C, RA-A, and YS wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This study was supported by Miguel Servet Tipo I Project grant, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (CP15/00132), the Instituto de Salud Carlos III, Proyectos de Investigación en Salud (Grant No. PI16/01378). YS is supported by the Subprograma Miguel Servet Tipo I from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (CP15/00132).

INTRODUCCIÓN

- serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 5641–5646. doi: 10.1128/AAC.01097-15
- Bonchi, C., Imperi, F., Minandri, F., Visca, P., and Frangipani, E. (2014). Repurposing of gallium-based drugs for antibacterial therapy. *Biofactors* 40, 303–312. doi: 10.1002/biof.1159
- Brown, D. (2015). Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 821–832. doi: 10.1038/nrd4675
- Butts, A., Koselny, K., Chabrier-Roselló, Y., Semighini, C. P., Brown, J. C. S., Wang, X., et al. (2014). Estrogen receptor antagonists are anti-cryptococcal agents that directly bind EF hand proteins and synergize with fluconazole in vivo. *mBio* 5:e765-13. doi: 10.1128/mBio.00765-13
- Chavez-Dozal, A. A., Lown, J., Jahng, M., Walraven, C. J., and Lee, S. A. (2014). *In vitro* analysis of finasteride activity against *Candida albicans* urinary biofilm formation and filamentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5855–5862. doi: 10.1128/AAC.03137-14
- Chen, W., Mook, R. A. Jr., Premont, R. T., and Wang, J. (2018). Niclosamide: beyond an anthelmintic drug. *Cell Signal.* 41, 89–96. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.04.001
- Chitambar, C. R. (2010). Medical applications and toxicities of gallium compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 2337–2361. doi: 10.3390/ijerph7052337
- Christiansen, S. H., Murphy, R. A., Juul-Madsen, K., Fredborg, M., Hvam, M. L., Axelgaard, E., et al. (2017). The immunomodulatory drug glatiramer acetate is also an effective antimicrobial agent that kills Gram-negative bacteria. *Sci. Rep.* 7:15653. doi: 10.1038/s41598-017-15969-3
- Corriden, R., Hollands, A., Olson, J., Derieux, J., Lopez, J., Chang, J. T., et al. (2015). Tamoxifen augments the innate immune function of neutrophils through modulation of intracellular ceramide. *Nat. Commun.* 6:8369. doi: 10.1038/ncomms9369
- Costabile, G., d'Angelo, L., Rampioni, G., Bondi, R., Pompili, B., Ascenzioni, F., et al. (2015). Towards repositioning niclosamide for anti-virulence therapy of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections: development of inhalable formulations through nanosuspension technology. *Mol. Pharm.* 12, 2604–2617. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00098
- Cowen, L. E., Sanglard, D., Howard, S. J., Rojers, P. D., and Perlin, D. S. (2015). Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5:a019752. doi: 10.1101/cshperspect.a019752
- D'Angelo, F., Baldelli, V., Halliday, N., Pantalone, P., Politicelli, F., Fiscarelli, E., et al. (2018). Identification of FDA-approved drugs as antivirulence agents targeting the pqs quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e1296–e1218. doi: 10.1128/AAC.01296-18
- de Léséleuc, L., Harris, G., KuoLee, R., and Chen, W. (2012). *In vitro* and *in vivo* biological activities of iron chelators and gallium nitrate against *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5397–5400. doi: 10.1128/AAC.00778-12
- Delattin, N., De Brucker, K., Vandamme, K., Meert, E., Marchand, A., Chaltin, P., et al. (2014). Repurposing as a means to increase the activity of amphotericin B and caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1035–1044. doi: 10.1093/jac/dkt449
- Dogra, N., Kumar, A., and Mukhopadhyay, T. (2018). Fenbendazole acts as a moderate microtubule destabilizing agent and causes cancer cell death by modulating multiple cellular pathways. *Sci. Rep.* 8:11926. doi: 10.1038/s41598-018-30158-6
- Drug Bank. (2018). *Clomiphene*. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00882>
- Dutta, N. K., Annadurai, S., Mazumdar, K., Dastidar, S. G., Kristiansen, J. E., Molnar, J., et al. (2007). Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30, 242–249. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.04.018
- Farha, M. A., Czarny, T. L., Myers, C. L., Worrall, L. J., French, S., Conrady, D. G., et al. (2015). Antagonism screen for inhibitors of bacterial cell wall biogenesis uncovers an inhibitor of undecaprenyl diphosphate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 11048–11053. doi: 10.1073/pnas.1511751112
- Fischbach, M. A., and Walsh, C. T. (2009). Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 325, 1089–1093. doi: 10.1126/science.1176667
- Flores, R., Döhrmann, S., Schaal, C., Hakkim, A., Nizet, V., and Corriden, R. (2016). The selective estrogen receptor modulator raloxifene inhibits neutrophil extracellular trap formation. *Front. Immunol.* 7:566. doi: 10.3389/fimmu.2016.00566
- Frangipani, E., Bonchi, C., Minandri, F., Imperi, F., and Visca, P. (2014). Pyochelin potentiates the inhibitory activity of gallium on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5572–5575. doi: 10.1128/AAC.03154-14
- García-Contreras, R., Pérez-Eretza, B., Lira-Silva, E., Jasso-Chávez, R., Coria-Jiménez, R., Rangel-Vega, A., et al. (2014). Gallium induces the production of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathog. Dis.* 70, 95–98. doi: 10.1111/2049-632X.12105
- Gerits, E., Defraigne, V., Vandamme, K., De Cremer, K., De Brucker, K., Thevissen, K., et al. (2017). Repurposing toremifene for treatment of oral bacterial infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e1846–e1816. doi: 10.1128/AAC.01846-16
- Gi, M., Jeong, J., Lee, K., Lee, K. M., Toyofuku, M., Yong, D. E., et al. (2014). A drug-repositioning screening identifies pentetic acid as a potential therapeutic agent for suppressing the elastase-mediated virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7205–7214. doi: 10.1128/AAC.03063-14
- Gooyil, M., and Janda, K. D. (2016). Reprofiled anthelmintics abate hypervirulent stationary-phase *Clostridium difficile*. *Sci. Rep.* 6:33642. doi: 10.1038/srep33642
- Gupta, S., Cheung, L., Pokkali, S., Winglee, K., Guo, H., Murphy, J. R., et al. (2017). Suppressor cell-depleting immunotherapy with denileukin difitox is an effective host-directed therapy for tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 215, 1883–1887. doi: 10.1093/infdis/jix208
- Gupta, S., Tyagi, S., and Bishai, W. R. (2015). Verapamil increases the bactericidal activity of bedaquiline against *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 673–676. doi: 10.1128/AAC.04019-14
- Hendrix, A. S., Spoonmore, T. J., Wilde, A. D., Putnam, N. E., Hammer, N. D., Snyder, D. J., et al. (2016). Repurposing the nonsteroidal anti-inflammatory drug diflunisal as an osteoprotective, antivirulence therapy for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 5322–5330. doi: 10.1128/AAC.00834-16
- Hennessy, E., O'Callaghan, J., Mooij, M. J., Legendre, C., Camacho-Vanegas, O., Camacho, S. C., et al. (2014). The impact of simvastatin on pulmonary effectors of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *PLoS One* 9:e102200. doi: 10.1371/journal.pone.0102200
- Ho Sui, S. J., Lo, R., Fernandes, A. R., Caulfield, M. D., Lerman, J. A., Xie, L., et al. (2012). Raloxifene attenuates *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin production and virulence. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40, 246–251. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.05.009
- Holbrook, S. Y. L., Garzan, A., Dennis, E. K., Shrestha, S. K., and Tsoedikova, S. G. (2017). Repurposing antipsychotic drugs into antifungal agents: synergistic combinations of azoles and bromperidol derivatives in the treatment of various fungal infections. *Eur. J. Med. Chem.* 139, 12–21. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.07.030
- Imperi, F., Leoni, L., and Visca, P. (2014). Antivirulence activity of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 5:178. doi: 10.3389/fmicb.2014.00178
- Imperi, F., Massai, F., Facchini, M., Frangipani, E., Visaggio, D., Leoni, L., et al. (2013a). Repurposing the antimycotic drug flucytosine for suppression of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 7458–7463. doi: 10.1073/pnas.1222706110
- Imperi, F., Massai, F., Ramachandran Pillai, C., Longo, F., Zennaro, E., Rampioni, G., et al. (2013b). New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 996–1005. doi: 10.1128/AAC.01952-12
- Joffe, L. S., Schneider, R., Lopes, W., Azvedo, R., Staats, C. C., Kmetzsch, L., et al. (2017). The anti-helminthic compound mebendazole has multiple antifungal effects against *Cryptococcus neoformans*. *Front. Microbiol.* 8:535. doi: 10.3389/fmicb.2017.00535
- Jung, E. H., Meyers, D. J., Bosch, J., and Casadevall, A. (2018). Novel antifungal compounds discovered in medicines for malaria venture's malaria box. *mSphere* 3:e537-17. doi: 10.1128/mSphere.00537-17

INTRODUCCIÓN

- Kaneko, Y., Thoendel, M., Olakanmi, O., Britigan, B. E., and Singh, P. K. (2007). The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. *J. Clin. Invest.* 117, 877–888. doi: 10.1172/JCI30783
- Kulkarny, V. V., Chavez-Dozal, A., Rane, H. S., Jahng, M., Bernardo, S. M., Parra, K. J., et al. (2014). Quinacrine inhibits *Candida albicans* growth and filamentation at neutral pH. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7501–7509. doi: 10.1128/AAC.03083-14
- Kung, V. L., Ozea, E. A., and Hauser, A. S. (2010). The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 621–641. doi: 10.1128/MMBR.00027-10
- Lieberman, L. A., and Higgins, D. E. (2009). A small-molecule screen identifies the antipsychotic drug pimozide as an inhibitor of *Listeria monocytogenes* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 756–764. doi: 10.1128/AAC.00607-08
- Lieberman, O. J., Orr, M. W., Wang, Y., and Lee, V. T. (2014). High-throughput screening using the differential radial capillary action of ligand assay identifies ebelsen as an inhibitor of diguanylate cyclases. *ACS Chem. Biol.* 9, 183–192. doi: 10.1021/cb400485k
- Lim, L. E., Vilhêze, C., Ng, C., Jacobs, W. R. Jr., Ramón-García, S., and Thompson, C. J. (2013). Anthelmintic avermectins kill *Mycobacterium tuberculosis*, including multidrug-resistant clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1040–1046. doi: 10.1128/AAC.01696-12
- Lobato, L. S., Rosa, P. S., Ferreira Jda, S., Neumann Ada, S., da Silva, M. G., do Nascimento, D. C., et al. (2014). Statins increase rifampin mycobactericidal effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5766–5774. doi: 10.1128/AAC.01826-13
- Maitra, A., Bates, S., Shaik, M., Evangelopoulos, D., Abubakar, I., McHugh, T. D., et al. (2016). Repurposing drugs for treatment of tuberculosis: a role for non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Br. Med. Bull.* 118, 138–148. doi: 10.1093/bmb/ldw019
- Martin, R. J. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet. J.* 154, 11–34. doi: 10.1016/S1090-0233(05)80005-X
- Minandri, F., Bonchi, C., Frangipani, E., Imperi, F., and Visca, P. (2014). Promises and failures of gallium as an antibacterial agent. *Future Microbiol.* 9, 379–397. doi: 10.2217/fmb.14.3
- Misra, U. K., Kalita, J., and Nair, P. P. (2010). Role of aspirin in tuberculous meningitis: a randomized open label placebo controlled trial. *J. Neurol. Sci.* 293, 12–17. doi: 10.1016/j.jns.2010.03.025
- Nairn, B. L., Eliasson, O. S., Hyder, D. R., Long, N. J., Majumdar, A., Chakravorty, S., et al. (2017). Fluorescence high-throughput screening for inhibitors of TonB action. *J. Bacteriol.* 199, e889–e816. doi: 10.1128/JB.00889-16
- Nouari, W., Ysmail-Dahlouk, L., and Aribi, M. (2015). Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Immunopharmacol.* 30, 94–101. doi: 10.1016/j.intimp.2015.11.033
- Ogundeji, A. O., Pohl, C. H., and Sebolai, O. M. (2016). Repurposing of aspirin and ibuprofen as candidate anti-cryptococcus drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 4799–4808. doi: 10.1128/AAC.02810-15
- Omansen, T. F., Porter, J. L., Johnson, P. D., van der Werf, T. S., Stienstra, Y., and Stinear, T. P. (2015). *In-vitro* activity of avermectins against *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003549. doi: 10.1371/journal.pntd.0003549
- O'Neill, J. (2016). *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report, and Recommendations The Review on Antimicrobial Resistance*. Available at: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf
- Parihar, S. P., Guler, R., Khutlang, R., Lang, D. M., Hurdalay, R., Mhlanga, M. M., et al. (2014). Statin therapy reduces the *Mycobacterium tuberculosis* burden in human macrophages and in mice by enhancing autophagy and phagosome maturation. *J. Infect. Dis.* 209, 754–763. doi: 10.1093/infdis/jit550
- Peng, Z., Ling, L., Stratton, C. W., Li, C., Polage, C. R., Wu, B., et al. (2018). Advances in the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infections. *Emerg. Microbes Infect.* 7:15. doi: 10.1038/s41426-017-0019-4
- Perlmutter, J. I., Forbes, L. T., Krysan, D. J., Ebsworth-Mojica, K., Colquhoun, J. M., Wang, J. L., et al. (2014). Repurposing the antihistamine terfenadine for antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Chem.* 57, 8540–8562. doi: 10.1021/jm501068z
- Rajamuthiah, R., Fuchs, B. B., Conery, A. L., Kim, W., Jayamani, E., Kwon, B., et al. (2015). Repurposing salicylanilide anthelmintic drugs to combat drug resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 10:e0124595. doi: 10.1371/journal.pone.0124595
- Rampioni, G., Visca, P., Leoni, L., and Imperi, F. (2017). Drug repurposing for antiviral therapy against opportunistic bacterial pathogens. *Emerg. Top. Life Sci.* 1, 13–23. doi: 10.1042/ETLS20160018
- Rangel-Vega, A., Bernstein, L. R., Mandujano-Tinoco, E. A., García-Contreras, S. J., and García-Contreras, R. (2015). Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections. *Front. Microbiol.* 6:282. doi: 10.3389/fmicb.2015.00282
- Rani Basu, L., Mazumdar, K., Dutta, N. K., Karak, P., and Dastidar, S. G. (2005). Antibacterial property of the antipsychotic agent prochlorperazine, and its synergism with methdilazine. *Microbiol. Res.* 60, 95–100. doi: 10.1016/j.micres.2004.10.002
- Ribeiro, N. Q., Costa, M. C., Magalhães, T. F. F., Carneiro, H. C. S., Oliveira, L. V., Fontes, A. C. L., et al. (2017). Atorvastatin as a promising anticytotoxic agent. *Int. J. Antimicrob. Agents* 49, 695–702. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.04.005
- Routh, M. M., Chauhan, M. N., and Karuppaiyl, S. M. (2013). Cancer drugs inhibit morphogenesis in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Braz. J. Microbiol.* 44, 855–859. doi: 10.1590/S1517-83822013000300029
- Skerry, C., Pinn, M. L., Bruiners, N., Pine, R., Gennaro, M. L., and Karakousis, P. C. (2014). Simvastatin increases the *in vivo* activity of the first-line tuberculosis regimen. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2453–2457. doi: 10.1093/jac/dku166
- Soo, V. W., Kwan, B. W., Quezada, H., Castillo-Juárez, I., Pérez-Eretza, B., García-Contreras, S. J., et al. (2017). Repurposing of anticancer drugs for the treatment of bacterial infections. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 1157–1176. doi: 10.2174/1568026616666160930131737
- Sun, W., Park, Y. D., Sugui, J. A., Fothergill, A., Southall, N., Shinn, P., et al. (2013). Rapid identification of antifungal compounds against *Exserohilum rostratum* using high throughput drug repurposing Screens. *PLoS One* 8:e70506. doi: 10.1371/journal.pone.0070506
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 18, 318–327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- Thangamani, S., Mohammad, H., Abushahba, M. F., Sobreira, T. J., Hedrick, V. E., Paul, L. N., et al. (2016a). Antibacterial activity and mechanism of action of auranofoin against multi-drug resistant bacterial pathogens. *Sci. Rep.* 6:22571. doi: 10.1038/srep22571
- Thangamani, S., Mohammad, H., Abushahba, M. F., Sobreira, T. J., and Selem, M. N. (2016b). Repurposing auranofoin for the treatment of cutaneous staphylococcal infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 47, 195–201. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.12.016
- Thangamani, S., Mohammad, H., Abushahba, M. F. N., Hamed, M. I., Sobreira, T. J. P., Hedrick, V. E., et al. (2015a). Exploring simvastatin, an antihyperlipidemic drug, as a potential topical antibacterial agent. *Sci. Rep.* 5:16407. doi: 10.1038/srep16407
- Thangamani, S., Younis, W., and Selem, M. N. (2015b). Repurposing celecoxib as a topical antimicrobial agent. *Front. Microbiol.* 6:750. doi: 10.3389/fmicb.2015.00750
- Thangamani, S., Younis, W., and Selem, M. N. (2015c). Repurposing ebelsen for treatment of multidrug-resistant staphylococcal infections. *Sci. Rep.* 5:11596. doi: 10.1038/srep11596
- Tharmalingam, N., Port, J., Castillo, D., and Mylonakis, E. (2018). Repurposing the anthelmintic drug niclosamide to combat *Helicobacter pylori*. *Sci. Rep.* 8:3701. doi: 10.1038/s41598-018-22037-x
- Ueda, A., Attila, C., Whiteley, M., and Wood, T. K. (2009). Uracil influences quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and fluorouracil is an antagonist. *Microb. Biotechnol.* 2, 62–74. doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00060.x
- Vilaplana, C., Marzo, E., Tapia, G., Diaz, J., Garcia, V., and Cardona, P. J. (2013). Ibuprofen therapy resulted in significantly decreased tissue bacillary loads and increased survival in a new murine experimental model of active tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 208, 199–202. doi: 10.1093/infdis/jit152
- Wang, L. H., Xu, M., Fu, L. Q., Chen, X. Y., and Yang, F. (2018). The anthelmintic niclosamide inhibits cancer stemness, extracellular matrix remodeling, and

INTRODUCCIÓN

- metastasis through dysregulation of the nuclear β -catenin/c-Myc axis in OSCC. *Sci. Rep.* 8:12776. doi: 10.1038/s41598-018-30692-3
- Warrell, R. P. Jr., Israek, R., Frisone, M., Snyder, T., Gaynor, J. J., and Bockman, R. S. (1988). Gallium nitrate for acute treatment of cancer-related hypercalcemia. A randomized, double-blind comparison to calcitonin. *Ann. Intern. Med.* 108, 669–674. doi: 10.7326/0003-4819-108-5-669
- Xue, M. L., Zhu, H., Thacur, A., and Willcox, M. (2002). $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol. Cell Biol.* 80, 340–345. doi: 10.1046/j.1440-1711.80.4august.1.x
- Yelin, I., and Kishony, R. (2018). SnapShot: antibiotic resistance. *Cell* 172, 1136–1136. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.018
- Yeo, W. S., Arya, R., Kim, K. K., Jeong, H., Cho, K. H., and Bae, T. (2018). The FDA-approved anti-cancer drugs, streptozotocin and floxuridine, reduce the virulence of *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 8:2521. doi: 10.1038/s41598-018-20617-5
- Zhang, X., Song, Y., Ci, X., An, N., Ju, Y., Li, H., et al. (2008). Ivermectin inhibits LPS-induced production of inflammatory cytokines and improves LPS-induced survival in mice. *Inflamm. Res.* 57, 524–529. doi: 10.1007/s00011-008-8007-8

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Miró-Canturri, Ayerbe-Algaba and Smani. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

II. FUNDAMENTOS

FUNDAMENTOS

Importantes organizaciones a nivel mundial consideran que el incremento y la diseminación de BGN multirresistentes se trata de una amenaza global para la salud pública. Por ello, se está haciendo hincapié en la necesidad de aportar medidas y planes que tengan como finalidad abordar el tratamiento de estas infecciones. La tasa de cepas resistentes a gran parte de los antibióticos usados en la práctica clínica, está conllevando a que cada vez el número de infecciones difíciles de tratar sea más alto, dando lugar a unas tasas de mortalidad las cuales merecen especial atención. En este contexto, la situación se ve agravada por la falta de desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas o estrategias de otro tipo para combatir las infecciones causadas por bacterias multirresistentes. En este escenario, el reposicionamiento de fármacos, estrategia que consiste en encontrar una nueva indicación para fármacos que están aprobados por la FDA y se encuentran en el mercado, parece un enfoque bastante prometedor a la hora de abordar el problema. Una de las razones es el acortamiento del tiempo y los costes que supone lanzar al mercado un fármaco reposicionado. Además, el amplio abanico de medicamentos existentes para cualquier tipo de enfermedad, constituyen una gran librería de compuestos con posible actividad antibacteriana. Así pues, fármacos con indicaciones muy diversas han mostrado eficacia, tanto *in vitro* como en estudios preclínicos, frente a diversos patógenos humanos. Entre ellos, se encuentran los anticancerígenos, que además de presentar acción frente a la bacteria, pueden originar respuestas en el huésped que promuevan una mejor respuesta a la infección (395,396). El anticancerígeno tamoxifeno, fármaco con el cual se tiene una amplia y larga experiencia, debido a que lleva usándose durante los últimos 30 años para el tratamiento de cáncer de mama, podría ser un candidato prometedor. Estudios recientes han mostrado su actividad frente a algunas bacterias grampositivas, hongos y virus (381). Otro grupo de candidatos son los antihelmínticos, usados para tratar helmintiasis humanas de distintas etiologías y con un uso extendido también en veterinaria. Miembros de esta gran familia, como la rafoxanida, pueden ser candidatos potenciales a ser reposicionados debido a su actividad antibacteriana en monoterapia y la posibilidad de usarlos como adyuvantes en combinación con antibióticos de uso frecuente (389,393).

Por ello, el uso del tamoxifeno, así como la rafoxanida pueden ser una aproximación terapéutica de interés frente a infecciones causadas por BGN.

III. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Las hipótesis de esta tesis doctoral son las siguientes:

Capítulo I. Reposicionamiento del tamoxifeno como estrategia antimicrobiana.

1. El tratamiento con tamoxifeno modula la respuesta inmune innata del huésped tras la infección por BGN.
2. La posible modulación de la respuesta inmune afectaría a la migración de células de origen en la médula ósea a los sitios de infección.
3. El tratamiento con tamoxifeno mejora la evolución de la infección causada por BGN en modelos experimentales murinos inmunodeprimidos e inmunocompetentes de sepsis peritoneal.
4. Los metabolitos del tamoxifeno generados *in vivo* están implicados en la actividad antimicrobiana del tamoxifeno frente a BGN multirresistentes.

Capítulo II. Reposicionamiento de la rafoxanida como tratamiento antimicrobiano.

1. La rafoxanida aumenta la actividad *in vitro* de la colistina frente a BGN sensibles y resistentes a colistina.
2. El mecanismo de acción de la rafoxanida para aumentar la actividad antimicrobiana de la colistina consiste en la alteración de la pared celular.
3. El tratamiento con rafoxanida mejora la evolución de la infección causada por BGN resistentes a colistina en modelos experimentales murinos inmunodeprimidos e inmunocompetentes de sepsis peritoneal.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis doctoral es el reposicionamiento de fármacos anticancerígenos y antihelmínticos para el tratamiento de infecciones causadas por BGN multirresistentes.

Capítulo I. Reposicionamiento del tamoxifeno como estrategia antimicrobiana.

1. Estudiar el efecto de la infección causada por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* sobre la migración de las células del sistema inmune innato (células de origen mieloide, monocitos y neutrófilos) desde la médula ósea hasta sangre y bazo, y sobre la liberación de MCP-1, IL-18 y la expresión de ERK fosforilada como vía de señalización de MCP-1.
2. Determinar el papel de MCP-1 en la migración de las células del sistema inmune inducida por la infección causada por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.
3. Determinar el efecto del tamoxifeno sobre la liberación de MCP-1 y su vía de señalización en ratones infectados con *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.
4. Estudiar el efecto del tamoxifeno sobre la migración de las células del sistema inmune desde la médula ósea hasta sangre y bazo, tras la infección por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* en ratones silvestres y deficientes en el gen *mcp-1*.
5. Estudiar el efecto del tamoxifeno sobre la actividad bactericida de los macrófagos y neutrófilos frente *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.
6. Evaluar la eficacia terapéutica del tamoxifeno en modelos de sepsis peritoneal murinos, inmunocompetentes o inmunodeprimidos, por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* mediante la determinación de la carga bacteriana en tejidos y sangre, y la supervivencia animal.
7. Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de los metabolitos del tamoxifeno frente a cepas de referencia y aislados clínicos de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Capítulo II. Reposicionamiento de rafoxanida como tratamiento antimicrobiano.

1. Estudiar el efecto sinérgico de rafoxanida en combinación con colistina frente a cepas de referencia y aislados clínicos de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina, mediante ensayo de tablero de ajedrez.
2. Evaluar la actividad sinérgica de rafoxanida en combinación con colistina frente a cepas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina mediante ensayo de curvas de letalidad.

OBJETIVOS

3. Determinar el mecanismo de acción de rafoxanida sobre cepas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina.
4. Evaluar la eficacia terapéutica de la rafoxanida en monoterapia y en terapia combinada con colistina frente a aislados clínicos de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* resistentes a colistina, en el modelo de sepsis peritoneal murina.

V. RESULTADOS

CAPÍTULO I

Reposicionamiento del tamoxifeno como
estrategia antimicrobiana

CAPÍTULO I. Artículo 2

1.1 Artículo 2. *Tamoxifen repurposing to combat infections by multidrug-resistant Gram-negative bacilli.*

El aumento de la resistencia antimicrobiana se trata de un problema a nivel global y existe una necesidad urgente de aportar soluciones inmediatas. La OMS ha publicado una lista de patógenos para los cuales es imprescindible la investigación y el desarrollo de nuevos antimicrobianos, entre ellos se incluyen los bacilos gramnegativos *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos. Debido a que los costes y el tiempo necesario para desarrollar un nuevo antimicrobiano son altos, la estrategia del reposicionamiento de fármacos se encuentra en auge. Siguiendo esta nueva tendencia, el objetivo principal de este capítulo fue estudiar la actividad antimicrobiana del tamoxifeno, un fármaco anticancerígeno usado para el tratamiento de cáncer de mama. El mecanismo de acción del tamoxifeno consiste en antagonizar el receptor de estrógenos, pero además, se ha descrito que puede estar implicado en otras vías de señalización celular como la vía de las MAPK o la regulación de células del sistema inmune. Esta premisa nos lleva a la hipótesis de que el tamoxifeno puede modular/regular el sistema inmune del huésped para una mejor resolución de la infección. En estudios publicados anteriormente, se ha demostrado que el tamoxifeno reduce la transcripción de MCP-1, quimioquina importante para la migración de monocitos desde la médula ósea hasta el torrente sanguíneo, y que además, ésta quimioquina se encuentra sobreexpresada en pacientes con sepsis y shock séptico. A su vez, MCP-1 está regulada por la vía de ERK y la expresión de IL-18.

Mediante ELISA y *Western Blot* se estudiaron los niveles de MCP-1, ERK e IL-18 en ratones y en una línea celular murina de macrófagos, infectados con *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* pre-tratados con tamoxifeno o sin tratamiento. La migración de las células de la inmunidad innata en respuesta a los mismos patógenos, incluyendo células de origen mieloide, monocitos y neutrófilos, se estudió mediante citometría de flujo en ratones *wild type* (WT), en ratones deficientes en el gen *mcp-1* (*mcp^{-/-}*) infectados y pretratados con tamoxifeno o sin tratamiento. Se evaluó la actividad *in vivo* del tamoxifeno usando modelos de sepsis peritoneal murinos (inmunodeprimidos e inmunocompetentes) de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Se estudió la función de los principales fagocitos, los macrófagos y neutrófilos, en respuesta a la infección y después del tratamiento con tamoxifeno. Finalmente, se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* de los metabolitos del tamoxifeno: n-desmetiltamoxifeno,

CAPÍTULO I. Artículo 2

endoxifeno y 4-hidroxitamoxifeno, mediante ensayos de microdilución y curvas tiempo-muerte frente a cepas de referencia y aislados clínicos de *A. baumannii* y *E. coli*.

Los resultados de este estudio muestran que el tamoxifeno reduce la expresión de MCP-1 (a través de su vía de señalización) en respuesta a la infección por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, reduciendo la migración de células de origen mieloide, monocitos y neutrófilos desde la médula ósea hasta la sangre, modulando en última instancia la respuesta inflamatoria mediada por estas células. En relación a la función de macrófagos y neutrófilos, el tratamiento con tamoxifeno aumenta la capacidad de estas células de eliminar *A. baumannii* y *E. coli*, hecho que también podría contribuir a la resolución de la infección. Además, en modelos de sepsis peritoneal murinos por los tres patógenos en ratones inmunocompetentes, el tratamiento con tamoxifeno aumentó la supervivencia animal hasta el 60-100% y redujo la carga bacteriana en bazo, pulmón y sangre entre 3 y 5 log₁₀ UFC/mL. En el caso de los ratones inmunodeprimidos, la supervivencia animal aumentó hasta el 20-60% y la carga bacteriana en sangre y tejidos se redujo en menor medida. Por último, aunque el tamoxifeno no presente actividad antibacteriana *in vitro*, este estudio muestra que la mezcla de sus tres metabolitos presenta actividad antibacteriana frente a una colección de aislados clínicos de *A. baumannii* y *E. coli in vitro*, sugiriendo que el metabolismo del tamoxifeno está relacionado con su eficacia terapéutica *in vivo*.

Por lo tanto, el tamoxifeno presenta eficacia frente a cepas susceptibles y MDR de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* siendo un potencial candidato a ser reposicionado.

El manuscrito resultante de este trabajo se encuentra bajo revisión.

CAPÍTULO I. Artículo 2

Title: Tamoxifen repurposing to combat infections by multidrug-resistant Gram-negative bacilli

Authors: Andrea. Miró-Canturri^{1,2†}, Rafael. Ayerbe-Algaba^{1,2†}, Raquel. del Toro^{2,3,5}, Jerónimo. Pachón^{2,4}, Younes. Smani^{1,2*}.

Affiliations

¹Clinical Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain.

²Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain.

³Department of Medical Physiology and Biophysics, Institute of Biomedicine of Seville, University of Seville, Sevilla, Spain.

⁴Department of Medicine, University of Seville, Seville, Spain.

⁵CIBER de enfermedades cardiovasculares (CIBER-CV), Spain.

Each affiliation should be a separate paragraph.

*To whom correspondence should be addressed: Younes Smani, Clinic Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío, Av. Manuel Siurot s/n, 41013, Seville, Spain. Tel: +34-955923100, E-mail: ysmani-ibis@us.es.

†Both authors have contributed equally to this work.

CAPÍTULO I. Artículo 2

ABSTRACT

The development of new strategic therapies for multidrug-resistant bacteria, like the use of non-antimicrobial approaches and/or drugs repurposing to be used as monotherapies or in combination with clinically relevant antibiotics, has become an urgent need. A therapeutic alternative for infections by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (MDR-GNB) is immune system modulation to improve the infection clearance. We showed that immunocompetent mice infected by *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* or *Escherichia coli* in peritoneal sepsis models and treated with tamoxifen at 80 mg/kg/d for three days reduced the release of MCP-1 and its signalling pathway IL-18 and phosphorylated ERK1/2. This reduction of MCP-1 induced the reduction of migration of inflammatory monocytes and neutrophils from bone marrow to blood. Indeed, the treatment with tamoxifen in murine peritoneal sepsis models reduced the bacterial load in tissues and blood; and increased the mice survival from 0% to 60-100%. Tamoxifen treatment of neutropenic mice infected by these pathogens increased mice survival up to 20-60%. Furthermore, susceptibility and time-kill assays showed that the metabolites of tamoxifen, N-desmethyltamoxifen, hydroxytamoxifen and endoxifen, the three together exhibited MIC₉₀ values of 16 mg/L and were bactericidal against clinical isolates of *A. baumannii* and *E. coli*. This antimicrobial activity of tamoxifen metabolites parallels an increased membrane permeability of *A. baumannii* and *E. coli* without affecting their outer membrane proteins profiles. Together, these data showed that tamoxifen present a therapeutic efficacy against MDR *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* in experimental models of infections and can be repurposed as new treatment for GNB infections.

INTRODUCTION

Infections caused by Gram-negative bacilli (GNB) such as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* represent an increasing worldwide problem. In 2017, the World Health Organization has listed these pathogens as the first antibiotic-resistant “priority pathogens” that pose the greatest threat to human health. There is, therefore, an urgent need to find new antimicrobial agents against extensive- and pan-drug-resistant GNB. Two key approaches can help alleviate the problem of antibiotic resistance, firstly targeting of bacterial virulence factors without inhibiting bacterial growth, which can slow the development of drug resistance by reducing the selective pressure on the bacteria (1, 2) and, secondly, by the modulation/regulation of

CAPÍTULO I. Artículo 2

the immune system response to improve the infection development (3, 4). In this way, some studies were focused on the stimulation of the immune system to treat bacterial infections using molecules, including lysophosphatidylcholine as monotherapy and as adjuvant for the antimicrobial treatment (3, 5, 6) or 3'-5'-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) which increase neutrophils protecting against *A. baumannii* infection (7).

Inflammatory monocytes and neutrophils derived from bone marrow are important cellular mediators of innate immune response against bacterial infections. During early stages of bacterial infection, both cell populations migrate from the bone marrow to the bloodstream and subsequently to the sites of infection (8, 9). This migration is regulated partially by the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), which expression is increased by bone marrow mesenchymal cells in response to circulating Toll-like receptor ligands and produces the mobilization of inflammatory monocytes (10). It is well established that MCP-1 release is controlled by IL-18 and ERK1/2 (11), and the levels of MCP-1 are higher in patients with sepsis and septic shock, and pneumonia (12, 13).

It is well documented that anti-cancer drugs like tamoxifen can modify the immune response by regulating cytokine release (14). Mechanistically, tamoxifen has been reported to reduce MCP-1 transcription and expression in human coronary artery endothelial cells and endometrial cancer cells, respectively (15, 16). As MCP-1 is involved in the immune cells migration, it may be hypothesized that an undiscovered connection between MCP-1 release and immune cells migration after bacterial infection and treatment with tamoxifen is present.

In prokaryotic cells, tamoxifen is known to present antifungal and antibacterial activities against *Mycobacterium tuberculosis* and some Gram-positive bacteria *in vitro* and *in vivo* (17, 18), but not against Gram-negative bacteria. As with other antimicrobial agent such as colistimethate sodium (19), tamoxifen is a prodrug and converted after liver passage to three major active metabolites, 4-hydroxytamoxifen, endoxifen and N-desmethyltamoxifen (20). However, their antibacterial activities remain unknown.

In this study, we report that tamoxifen downregulates the expression of MCP-1, impairing the migration of bone marrow derived cells to the bloodstream induced by *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* and, consequently, modulating the inflammatory response. In murine peritoneal sepsis model, we observe that tamoxifen decreases the development of infection by these pathogens, lowering their concentrations in tissues and blood and increasing the mice survival. Although tamoxifen did not present

CAPÍTULO I. Artículo 2

bactericidal nor bacteriostatic effects against *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* *in vitro*, we show that tamoxifen metabolites exhibit high antibacterial activity against *A. baumannii* and *E. coli*, suggesting that tamoxifen metabolism is actively involved in the therapeutic efficacy of tamoxifen *in vivo*.

RESULTS

Bone marrow immune cells migrates in response to MCP-1 and IL-18 during bacterial infection

To determine whether bacterial infection influences circulating immune cells from the bone marrow in response to MCP-1 and IL-18, a MCP-1 controller (11), we administered intraperitoneally *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* to mice and measured the proportions of myeloid cells CD11b⁺, inflammatory monocytes CD11b⁺Ly6C^{hi} and neutrophils CD11b⁺Ly6G⁺. *A. baumannii* administration decreased, 24 h after, the myeloid cells, inflammatory monocytes and neutrophils in bone marrow, and increased them in blood (Figures 1A, 1B and 1C). Same results were observed when mice were infected with *P. aeruginosa* and *E. coli* (Figures 1A, 1B and 1C). The rates of these immune cells in the spleen remained unchanged after infection with *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* for 24 h (Figure S1) indicating that the increase of circulating monocytes and neutrophils did not proceed from the splenic reservoir (21, 22).

A paradigm widely accepted is the formation of chemokine gradients to guide inflammatory cells to the sites of infection (23). Among them, MCP-1 has been shown to be involved in the migration of immune cells from the bone marrow to the bloodstream after binding to CCR2 receptor (24). As it is shown in the figure 1D, mice infected with *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* for 6 and 24 h increased significantly and progressively the release of MCP-1 in mice serum (between ≈ 1000 and $4000 \mu\text{g/mL}$). It is well known that MCP-1 release is controlled by IL-18 and ERK1/2 (11). Consequently, the levels of IL-18 in mice serum gradually increased 6 and 24 h after infection by *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. The IL-18 levels at 24 h were $2144 \pm 408.1 \mu\text{g/mL}$, $7286 \pm 1056 \mu\text{g/mL}$ and $3124 \pm 671.3 \mu\text{g/mL}$, respectively (Figure 1E). Moreover, ERK1/2 was phosphorylated 2 h after infection of RAW 264.7 macrophages cell line *in vitro* by *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*, defining the activation of kinase response to these pathogens (Figure 1F).

CAPÍTULO I. Artículo 2

To determine whether MCP-1 is involved in the migration of inflammatory monocytes and neutrophils from bone marrow to blood, wild-type (WT) and mice lacking MCP-1 protein (MCP-1 KO mice) were infected by *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. First, we detected MCP-1 release only in WT mice (Figure 2A). Importantly, the infection of MCP-1 KO mice by these pathogens showed that the migration of inflammatory monocytes and neutrophils from bone marrow to blood (Figures 2B and 2C) exhibits a reduction of $2.17 \pm 1.14\%$ and $4.13 \pm 0.99\%$, respectively, for *A. baumannii* infection. Similar results were observed when MCP-1 KO mice were infected with *P. aeruginosa* and *E. coli* strains (Figures 2B and 2C).

Non-infected WT and MCP-1 KO mice presented similar inflammatory monocytes and neutrophil proportions in bone marrow and blood indicating that the lack of MCP-1 did not affect the migration of these cells from bone marrow in basal conditions (Figures 2B and 2C). These data suggest that MCP-1 is involved in the traffic of immune cells from the bone marrow to blood after infection by *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*.

Tamoxifen impairs the migration of immune cells from bone marrow to blood through MCP-1 regulation

In order to study whether tamoxifen can modulate inflammation generated by bacterial infections, we treated RAW 264.7 macrophage cell line with tamoxifen during 24 h and infected them with *A. baumannii*, *P. aeruginosa* or *E. coli* for 2 h. After this incubation we determined the secretion of MCP-1 in the macrophage cells supernatant (ELISA assay) and the phosphorylation of ERK in the macrophage cells by Western blot. The treatment with tamoxifen decreased the release of MCP-1 and the phosphorylation of ERK1/2 in macrophages infected by these pathogens, compared to macrophages without tamoxifen treatment (Figures 3A and 3B). To confirm these data *in vivo*, mice were treated ip. with 3 doses of 80 mg/kg/d of tamoxifen before the bacterial infection. Serum was collected 6 and 24 h post-bacterial infection. Figure 3C revealed that treatment with tamoxifen reduced MCP-1 levels when compared with *A. baumannii*, *P. aeruginosa* or *E. coli* infected and not treated groups. It is noteworthy to highlight that IL-18 levels were also reduced after tamoxifen treatment of infected mice by *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* (Figure 3D). These results suggest that the reduction of IL-18 secretion due to tamoxifen injection may drive a reduction of MCP-1 release through a reduction of ERK phosphorylation. This MCP-1 reduction after

CAPÍTULO I. Artículo 2

tamoxifen injection could produce less migration of monocytes and neutrophils from the bone marrow to the blood.

In order to confirm whether tamoxifen treatment reduces the proportions of myeloid cells, inflammatory monocytes and neutrophils in bone marrow and blood, we administered tamoxifen in mice before infection by *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* for 24 h. Flow cytometric analysis demonstrated that treatment with tamoxifen reduced the migration of these cells to the blood and the levels in bone marrow were maintained compared with the levels of infected group (Figures 4A, 4B and 4C).

MCP-1 KO mice showed an impaired migration of inflammatory monocytes and neutrophils from bone marrow to blood after bacterial infection (Figures 2B and 2C). In order to determine whether tamoxifen is able to reduce this migration in mice deficient in MCP-1 secretion, we treated MCP-1 KO mice with tamoxifen and infected them with *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. As it is shown in the figures 5A and 5B, tamoxifen treated mice presented a reduction in the migration of inflammatory monocytes and neutrophils, despite of the lack of MCP-1. Both populations were more present in bone marrow and the frequencies in the blood were also reduced when compared with WT mice treated with tamoxifen and infected by these pathogens, indicating that tamoxifen may probably regulate other chemokines and migration pathways involved in this phenomenon (Figure S2, Figure 5).

Tamoxifen enhances bacterial killing of macrophages and neutrophils *in-vitro*

Recent studies reported that treatment with tamoxifen enhances neutrophil activity by increasing the NETosis and induces changes in macrophages by inhibiting the expression of CD36 and PPAR γ reducing atherosclerosis (25, 26), but there are no data regarding the immune function of both cells treated with tamoxifen after a bacterial infection. To determine whether tamoxifen can increase the killing activity of macrophages and neutrophils, assays with RAW 246.7 cell line and HL-60 neutrophils cell line pretreated with tamoxifen and infected by *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* were performed. We demonstrated that macrophages incubation with tamoxifen (2.5 mg/L) at 2 and 6 h followed by infection with *A. baumannii* during 2 h decreased the bacterial internalization by 10 and 30%, respectively (Figure S3A), without affecting the amount of *A. baumannii* in the extracellular medium (Figure S3B). Similar results were observed after treatment with tamoxifen and infection by *E. coli*, but not by *P. aeruginosa* (Figure S3A). Regarding neutrophil activity, incubation with 2.5 mg/L of

CAPÍTULO I. Artículo 2

tamoxifen during 2 and 6 h followed by the infection with *A. baumannii* during 2 h increased bacterial killing by 5 and 25%, respectively. Similar results were observed after treatment with tamoxifen and infection by *E. coli*, but not by *P. aeruginosa* (Figure S3A).

Accordingly, tamoxifen treatment increases the killing activity of macrophages and neutrophils against *A. baumannii* and *E. coli* but not against *P. aeruginosa*.

Tamoxifen increase mice survival and decrease the bacterial burden in a murine sepsis model by *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*

Our results demonstrated that tamoxifen plays an important role in innate immune cells trafficking after bacterial infection. Going further we wanted to know whether tamoxifen could protect the mice against a lethal bacterial inoculum. We treated mice with tamoxifen (80 mg/kg/d) administered intraperitoneally three days before the infection with a minimal lethal dose 100 (MLD100) of *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. Pretreatment with tamoxifen increased mice survival after infection by *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* to 100, 66.7 and 83.3% ($P<0.01$), respectively (Figure 6A). Figure 6B shows that treatment with tamoxifen decreased spleen and lung bacterial concentrations of these pathogens by 6.64 and 7.17 \log_{10} CFU/g ($P<0.015$; for *A. baumannii*), by 3.58 and 5.1 \log_{10} CFU/g ($P<0.015$; for *P. aeruginosa*), and by 3.7 and 4.16 \log_{10} CFU/g ($P<0.015$; for *E. coli*), compared with the control infected groups. Blood bacterial concentrations presented a decrease compared to control infected groups of 5.53, 5.45 and 4.31 \log_{10} CFU/mL ($P<0.01$) for *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*, respectively. Similar efficacy of tamoxifen was observed in murine peritoneal sepsis model by susceptible and MDR clinical isolates of *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. Treatment with tamoxifen increased the mice survival to 66.7, 83.3 and 50% ($P<0.01$) for the non-MDR *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*, respectively, and 83.3, 66.7 and 50% ($P<0.01$) for the MDR *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* harboring *mcr-1* gene (Figure 6C). These findings indicate that tamoxifen treatment presents a good therapeutic efficacy against reference and clinical isolates of *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*.

Immunosuppressed mice respond to tamoxifen treatment

Previous studies have demonstrated that infection with *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* in immunosuppressed mice is lethal (27-29). To determine whether tamoxifen

CAPÍTULO I. Artículo 2

treatment is still therapeutically effective in immunosuppressed mice, we treated immunocompetent mice with cyclophosphamide to reduce the circulating monocytes and neutrophils (Figure S4). After *A. baumannii* and *E. coli* infection in these immunosuppressed mice, tamoxifen treatment increase mice survival in both groups to 66.67 % (Figure 7A); however, with *P. aeruginosa* the survival was only 16.67% (Figure 7A). Bacterial loads of *A. baumannii* and *E. coli* in spleen, lung and blood were reduced in immunosuppressed mice after treatment with tamoxifen, likewise in immunocompetent mice. In contrast, bacterial loads of *P. aeruginosa* in tissues and blood were not reduced in immunosuppressed mice after treatment with tamoxifen (Figure 7B). These findings suggest that tamoxifen help to clear the infection by *A. baumannii* and *E. coli* even though mice were immunosuppressed by an additional independent immune response mechanism.

Tamoxifen metabolites present antibacterial activity targeting the bacterial membrane

Despite the fact that tamoxifen has no bactericidal activity *in vitro* (MIC > 256 mg/L), we reasoned that the *in vivo* antimicrobial activity of tamoxifen observed in neutropenic mice should result from tamoxifen metabolism in mice organism. Susceptibility assays showed that these tamoxifen metabolites together exhibit MIC₅₀ values of 8 and 16 mg/L against 100 and 47 clinical isolates of *A. baumannii* and *E. coli*, respectively (Figure 8A). These data were confirmed by time-kill assays showing that tamoxifen metabolites had excellent bactericidal activity against MDR *A. baumannii* and *E. coli* strains during 8 h of growth (Figure 8B).

In order to determine the mode of action of tamoxifen metabolites, we examined their effect on the membrane permeability. Tamoxifen metabolites strongly increased the membrane permeability time-dependent (Figure 8C), without affecting the outer membrane proteins (OMPs) profile (Figure 8D). This suggests that tamoxifen metabolites affect only the integrity of the bacterial cell wall without changing the expression of the OMPs. Determining the specific mechanism of action of tamoxifen metabolites requires further investigation.

DISCUSSION

The present study provides new data highlighting the antibacterial effect of tamoxifen and its metabolites. Here, we provide the first evidence of an essential role played by

CAPÍTULO I. Artículo 2

tamoxifen in the regulation of immune cells traffic after bacterial infection, in order to reduce the hyperinflammation caused by sepsis, and its antibacterial activity *in vivo* through the generation of active metabolites presenting bactericidal activity against GNB.

This study, as well as previous works (8, 9), showed that the regulation of inflammatory monocytes and neutrophils migration are important in the host defense against bacterial infections. This is consistent with the immune system modulation that improves the bacterial infection clearance (4). Exploiting immunomodulatory drugs, approved by the regulatory agencies for clinical indication different to bacterial infection therapy, has several advantages (30); thus, information of their pharmacological characteristics (toxicity and pharmacokinetics) in preclinical and clinical trials is available. Therefore, the time and the economic costs of the evaluation of these drugs in other therapeutic applications, such as the treatment of bacterial infections, will be reduced (31). Among these immunomodulatory drugs, we found tamoxifen as a promising therapeutic candidate; which has showed antifungal and antibacterial activities against *M. tuberculosis* and some Gram-positive bacteria *in vitro* and *in vivo* (17, 18, 25).

Here, we showed that tamoxifen reduces the release of MCP-1 and IL-18, and the phosphorylation of ERK, which contributes to efficient reduction of migration of inflammatory monocytes and neutrophils from bone marrow to blood. Recruitment of both immune cells from bone marrow to blood during systemic infection with GNB is probably mediated by multiple pathways dependent or independent to MCP-1 such as MyD88 and MIP-2 (32-34). MyD88 has been reported to induce MCP-1 release of macrophages after their infection by *Listeria monocytogenes* (32). In contrast, to our knowledge, MIP-2 is not involved in the release of MCP-1 by eukaryotic cells. The presence of pathways independent to MCP-1 has been confirmed in this study in MCP-1 KO mice infected by *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*, which inflammatory monocytes and neutrophils still migrate at lower levels from bone marrow to bloodstream. Previous independent work reported that deletion of MCP-1 in mice did not abolish completely the recruitment of monocytes during the infection by *L. monocytogenes* and this recruitment was diminished by 40-50% (35), suggesting the involvement of MCP-3, another monocyte chemoattractant protein, after binding to CCR2 receptor in the systemic bacterial infection (36). Regarding neutrophils, although it is widely accepted that MIP-2 stimulates their migration from bone marrow (37, 38), we demonstrated for the first time that in MCP-1 KO mice the migration of neutrophils

CAPÍTULO I. Artículo 2

from bone marrow to bloodstream after GNB infection was diminished, suggesting the involvement of MCP-1 in this process. This result is consistent with previous observation that MCP-1 regulates the recruitment of neutrophils to the lung after *E. coli* infection (34). Based on these data, MCP-1 plays an important role in the migration of inflammatory monocytes and neutrophils from bone marrow to bloodstream. However, this migration in MCP-1 KO mice infected by GNB and treated with tamoxifen is reduced but not abolished. A possible explanation could be the involvement of other MCP-1-independent pathways regulated by tamoxifen. In this context, further studies are required to decipher the role of these MCP-1-independent pathways in this process.

A consequence of the reduction in monocyte proportions in blood after treatment with tamoxifen would be the reduction of macrophages and dendritic cells in blood and tissues. Although the number of macrophages and neutrophils recruited to the sites of infection in mice treated with tamoxifen would be lower, our *in-vitro* assays suggested that their killing activity against *A. baumannii* and *E. coli* was enhanced by tamoxifen. The inflammatory monocytes are the precursors of a subset of dendritic cells (TipDC), which produce tumor necrosis factor- α (TNF- α) and inducible oxide synthase (iNOS) contributing to the innate defense against *L. monocytogenes* infection (39, 40). In contrast, other study reported that the reduction of proinflammatory monocytes and TipDC during *Trypanosoma brucei* infection diminished their pathogenicity (41). These contradictory results in the effect of monocytes and TipDC recruitment on host survival could be explained by the difference in cellular location of each pathogen, *L. monocytogenes* is intracellular whereas *T. brucei* remains in plasma (9). Moreover, it is reported that tamoxifen inhibits *in vitro* the maturation of TipDC, in presence of 17 β -estradiol, which not respond enough to bacterial LPS (42). We suggest that the reduction in the dendritic cells' proportions joined with their less maturation after tamoxifen treatment produced a reduction in TNF- α and iNOS production, minimizing their deleterious effects in sepsis situation. In our study, we found that mice treatment with tamoxifen reduce the release of proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 (data not shown). Accordingly, although we previously pointed that *A. baumannii* could support intracellular lifestyle (43, 44), bacterial species used in our study are viewed as extracellular pathogens and are present in blood. Consequently, it is possible that in our model of study, reduction of monocyte and TipDC frequencies by tamoxifen treatment, and the reduction of proinflammatory cytokines release may play an important role in the therapeutic efficacy of tamoxifen.

CAPÍTULO I. Artículo 2

It is noteworthy that tamoxifen therapeutic efficacy is not only based in their role regulating the innate immune response, but it is different depending on the type of bacteria. Previous study showed the antibacterial effect of tamoxifen against *Staphylococcus aureus* (25). In the present study, we demonstrate the excellent therapeutic efficacy of tamoxifen against susceptible and MDR *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*, even though this efficacy is slightly lower against *P. aeruginosa*. However, tamoxifen reduced the migration of immune cells from bone marrow to blood in mice infected by these three pathogens at similar levels. A possible explanation could be the involvement of an additional independent immune response mechanism. This hypothesis is in agreement with the results we obtained in neutropenic mice, in which tamoxifen has a therapeutic efficacy against *A. baumannii* and *E. coli*, but not against *P. aeruginosa*. In addition, the three major active metabolites of tamoxifen, 4-hydroxytamoxifen, endoxifen and N-desmethyltamoxifen, as a consequence of its extensive metabolization by cytochrome P450 enzymes (20), present bactericidal activity in monotherapy against *A. baumannii* and *E. coli*, but not against *P. aeruginosa*. These results are consistent with a therapeutic efficacy of tamoxifen depending on antibacterial activity, as addition to the immune response mechanisms. Together, these data indicate that treatment with tamoxifen may be useful for patients with infections by Gram-negative bacilli.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Tamoxifen, N-desmethyltamoxifen, endoxifen and 4-hydroxytamoxifen, porcine mucin, protease inhibitors were obtained from Sigma, Spain. Cyclophosphamide was obtained from Baxter, Spain.

Bacterial strains

Reference *A. baumannii* ATCC 17978 (45), *P. aeruginosa* PAO1 (46) and *E. coli* ATCC 25922 (47) strains were used. We also used 2 clinical susceptible (Ab9) and multidrug-resistant (MDR) (Ab186) *A. baumannii* from REIPI-GEIH 2010 collection (5), 2 clinical susceptible (Pa39) and MDR (Pa238) *P. aeruginosa* from REIPI-GEIH 2008 collection (48), and 2 clinical susceptible (C1-7-LE) and MDR (EcMCR⁺, carrying *mcr-1* gene) *E. coli* (49, 50). We also used a collection of *A. baumannii* and *E.*

CAPÍTULO I. Artículo 2

coli clinical strains from REIPI-GEIH 2010 collection and Bact-OmpA collection (51, 52).

Animals

Immunocompetent C57BL/6 female mice (16-18 g) were obtained from the University of Seville facility. MCP-1 KO mice were generated with C57BL/6 background and obtained from Jackson Laboratory, USA. All mice had the sanitary status of murine pathogen free and were assessed for genetic authenticity and housed in regulation cages with food and water ad libitum. This study was carried out in strict accordance with the protocol approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University Hospital of Virgen del Rocío, Seville (0704-N-18). All surgery was performed under sodium thiopental anaesthesia and all efforts were made to minimize suffering.

Immunosuppressed mice

Blood frequencies of monocytes and neutrophils were reduced with cyclophosphamide treatment following the protocol of Zuluaga *et al.* (29). Immunocompetent C57BL/6 female mice were treated with cyclophosphamide at 100 and 150 mg/kg at day 4 and 1, respectively, before the bacterial infection.

***A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* peritoneal sepsis models**

Murine peritoneal sepsis models with *A. baumannii*, *P. aeruginosa* or *E. coli* strains were established by ip. inoculation of the bacteria in immunocompetent and neutropenic mice (2). Briefly, 6 mice for each group were inoculated with the minimal bacterial lethal dose 100 (MLD100) of the bacterial suspensions mixed in a 1:1 ratio with a saline solution containing 10% (w/v) porcine mucin. The MLD100 of ATCC 17978, Ab9, Ab186, PAO1, Pa39, Pa238, ATCC 25922, C1-7-LE and EcMCR-1⁺ were 3.2, 5.9, 5.0, 4.9, 3.85, 6.7, 4.7, 2.91 and 6 log CFU/mL, respectively. Mortality was recorded over 3 or 7 days. After the death or sacrifice of the mice at the end of the experimental period, aseptic thoracotomies were performed, and blood samples were obtained by cardiac puncture. The spleen and lungs were aseptically removed and homogenized (Stomacher 80; Tekmar Co., USA) in 2 mL of sterile NaCl 0.9% solution. Ten-fold dilutions of the homogenized spleen, lungs and blood were plated onto Sheep blood agar (Becton

CAPÍTULO I. Artículo 2

Dickinson Microbiology Systems, USA) for quantitative cultures. If no growth was observed after plating the whole residue of the homogenized tissue and blood, a logarithm value corresponding to the limit of detection of the method (1 CFU) is assigned.

Therapeutic effect of tamoxifen in immunocompetent murine models of peritoneal sepsis

The immunocompetent murine peritoneal sepsis models by *A. baumannii* (ATCC 17978, Ab9 and Ab186), *P. aeruginosa* (PAO1, Pa39 and Pa238), or *E. coli* (ATCC 25922, C1-7-LE and EcMCR-1⁺) strains were established by ip. inoculation of the bacteria in immunocompetent mice. Briefly, 6 animals of each group were infected ip. with 0.5 mL of the MLD100 of each strain mixed 1:1 with 10% porcine mucin. Tamoxifen therapy was administered for 3 days at one safe dose of 80 mg/kg/d before bacterial inoculation. Mice were randomly ascribed to the following groups: 1). controls (without treatment), and 2). Tamoxifen administered at 80 mg/kg/d ip. for 3 days before bacterial inoculation with each strain. Mortality and bacterial loads in tissues and blood were determined as in “*A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* peritoneal sepsis models” section.

Therapeutic effect of tamoxifen in immunosuppressed murine models of peritoneal sepsis

The neutropenic murine peritoneal sepsis models by *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC 25922 strains were established by ip. inoculation of the bacteria in neutropenic mice. Briefly, animals (6 mice for each group) were infected ip. with 0.5 mL of the MLD100 of each strain mixed 1:1 with 10% porcine mucin. Tamoxifen therapy, mortality and bacterial loads in tissues and blood were determined as in “Therapeutic effect of tamoxifen in immunocompetent murine models of peritoneal sepsis” section.

Flow cytometry

Blood and bone marrow cells, and spleen samples were prepared from control and infected mice with DML100 of ATCC 17978, PAO1 and ATCC 25922 and pretreated or not with tamoxifen as described before (3, 53). Briefly, blood samples were harvested from mouse periorbital plexuses and resuspended in EDTA. Bone marrow

CAPÍTULO I. Artículo 2

cells were collected by flushing mouse femurs with ice-cold PBS, and red blood cells were depleted by lysis in a lysis buffer containing 0.15 M NH_4Cl , 0.01 M KHCO_3 and 0.01 M of disodium-EDTA. Spleen samples were harvested, homogenized and filtered through a 20 μm mesh prior to red blood cells depletion by lysis buffer. Bone marrow and spleen samples were lysed by lysis buffer for 10 min at 4 °C, whereas blood samples were lysed for 10 min at room temperature. Cells ($1\text{-}2 \times 10^6$ cells per sample) were resuspended in PBS with 2% FBS and then incubated with the appropriate dilution of antibody conjugates. Samples were analyzed with LSRFortessa Flow Cytometer (BD Biosciences, USA) and data obtained were analyzed with DIVA software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). The staining protocols included combination of the following antibodies: anti-CD11b (clone M1/70, APC), anti-Ly6C (clone, AL-21, FITC) and anti-Ly6G (clone 1A8, PE) (BD Bioscience, Spain) diluted at 1:300 in PBS with 2% fetal bovine serum.

Cytokine assays

Blood samples were collected from periorbital plexuses of mice infected with DML100 of ATCC 17978, PAO1 and ATCC 25922 and pretreated or not with tamoxifen as previously described (11). Serum levels of murine MCP-1, IL-6, IL-18 and TNF- α were collected 6 and 24 h post-bacterial infection without or with tamoxifen treatment. MCP-1, IL-6, IL-18 and TNF- α levels were determined by ELISA kit (ThermoFisher, for MCP-1) and (Affymetrix eBioscience, for IL-6, IL-18 and TNF- α) in accordance with the manufacturer's instructions. Furthermore, extracellular medium of RAW 264.7 macrophages cells infected with 8 log CFU/mL of ATCC 17978, PAO1 and ATCC 25922, and pre-incubated or not with 2.5 mg/L tamoxifen for 24 h previous was collected to determine the MCP-1 levels.

Cell culture and infection

Macrophages cell line RAW 264.7 were obtained from American Type Culture Collection (LGC, UK) and were grown in DMEM medium (Invitrogen, Spain) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, vancomycin (50 mg/L), gentamicin (20 mg/L), amphotericin B (0.25 mg/L) (Invitrogen, Spain) and 1% HEPES (Invitrogen, Spain) in a humidified incubator, 5% CO_2 at 37 °C, as described previously (54). RAW 264.7 cells were routinely passaged every 3-4 days. The cells were seeded 24 h in 24 well plates before bacterial infection for western blot and adhesion assay.

CAPÍTULO I. Artículo 2

Human promyelocytic leukemia HL-60 cells (ATCC CCL-240) were grown in RPMI 1640 medium (GE Healthcare Life Sciences, Spain) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine (Sigma, Spain), 25 mM HEPES, and penicillin/streptomycin solution in a humidified incubator, 5% CO₂ at 37 °C. HL-60 cells culture and differentiation were performed as previously described with minor changes (55). HL-60 cells were incubated with 1.3% DMSO (Sigma, Spain) for 7 days and their differentiation into neutrophils (referred to as HL-60 neutrophils) was monitored by flow cytometry analysis using anti-CD11b (clone ICRF44, APC) (Biolegend) and DAPI as viability marker.

Western blot immunoblotting

Proteins of infected RAW 264.7 macrophages cells with 8 log CFU/mL of ATCC 17978, PAO1 and ATCC 25922, and pre-incubated or not with 2.5 mg/L tamoxifen were collected, homogenized in RIPA buffer supplemented with 1 mM PMSF and 10% cocktail of protease inhibitors and centrifuged at 13,000 g for 20 min at 4°C. The supernatant was removed and the amount of proteins was determined using the BCA assay (Promega, Spain). The samples were stored at -80°C until later use. Six µg of proteins of each sample were mixed with an equal volume of 2x Laemmli buffer, denaturated by heating the mixture for 5 min at 95°C, and then resolved by 4-15% SDS-PAGE. The separated proteins were transferred using polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Amersham Bioscience, Spain), and the membranes were blocked for 2 h with PBS and 0.1% (v/v) Tween 20 (PBST buffer) containing 5% (w/v) milk. The PVDF membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibody: rabbit anti-mouse p44/42 MAPK (Erk1/2) (1:1000 dilution), Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (1:1000 dilution) and β-actin (1:1000 dilution) (Cell Signaling Technology, Spain) diluted in PBST buffer containing 5% milk. After washing with PBST buffer, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with a horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG as secondary antibody (GE Healthcare, Spain) (dilution 1:2000) diluted in PBST buffer containing 5% milk. Subsequently, immunoreactive proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence protocol (Super ECL, Thermo Scientific, USA).

CAPÍTULO I. Artículo 2

Macrophages adhesion assay

RAW 264.7 cells were pretreated with 2.5 mg/L tamoxifen for 2, 6 and 24 h; and infected with ATCC 17978, PAO1 and ATCC 25922 strains (MOI 1:100) for 2 h with 5% CO₂ at 37°C. Subsequently, infected RAW 264.7 macrophages cells were washed five times with prewarmed PBS and lysed with 0.5 % Triton X-100. Diluted lysates were plated onto Sheep blood agar and incubated at 37 °C for 24 h for enumeration of developed colonies and then the determination of the number of bacteria that attached and invaded RAW 264.7 cells. Alternatively, we determined the concentration of the extracellular medium bacteria by plating diluted extracellular medium onto Sheep blood agar.

HL-60 neutrophils were pretreated with 2.5 mg/L for 2 and 6 h; and infected with ATCC 17978, PAO1 and ATCC 25922 strains (MOI 1:100) for 2 h with 5% CO₂ at 37°C. Subsequently, HL-60 neutrophils were washed five times with prewarmed PBS by centrifugation and lysed with 0.5 % Triton X-100. Diluted lysates were plated onto Sheep blood agar and incubated at 37 °C for 24 h for enumeration of developed colonies and then the determination of the number of bacteria. The neutrophil killing index was calculated according to the formula: [(CFU in the absence of neutrophils – CFU in the presence of neutrophils)/ CFU in the absence of neutrophils] × 100 (56).

***In vitro* susceptibility testing and time-kill experiments**

The MICs of N-desmethyltamoxifen, endoxifen and 4-hydroxytamoxifen and the mixture of the 3 tamoxifen metabolites against *A. baumannii* and *E. coli* clinical strains were determined by microdilution assay in two independent experiments, in accordance with CLSI guideline (57).

Time-kill kinetic assays of the Ab9 and EcMCR⁺ strains were conducted in Moeller Hinton Broth in the presence of the mixture of the 3 tamoxifen metabolites at 4xMIC, and were performed in duplicate as previously described (57). Drug-free broth was evaluated in parallel as a control and cultures were incubated at 37°C. Viable counts were determined by serial dilution at 0, 2, 4 and 8 h after adding the 3 tamoxifen metabolites, and plating 100 µL of control, test cultures or dilutions at the indicated times onto sheep blood agar plates. Plates were incubated for 24 h and, after colony counts, the log₁₀ of viable cells (CFU/mL) was determined.

CAPÍTULO I. Artículo 2

Analysis of outer membrane proteins (OMPs) by SDS-PAGE

Bacterial cells of MDR *A. baumannii* and MDR *E. coli* were grown in LB broth to the logarithmic phase, incubated with 2 and 16 mg/L of tamoxifen metabolites mixture, respectively, for 4 or 24 h and lysed by sonication. OMPs were extracted with sodium lauroylsarcosinate (Sigma, Spain) and recovered by ultracentrifugation as described previously (43). The OMP profiles were determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 10% SDS gels and 6 µg protein of OMPs, followed by Simply Blue SafeStain gel (Invitrogen, Spain).

Membrane permeability assays

Bacterial suspensions (adjusted to O.D₆₀₀ = 0.2) of MDR *A. baumannii* and MDR *E. coli* were placed into a 96-well plate, incubated with 2 and 16 mg/L of tamoxifen metabolites mixture, respectively, and mixed in a solution of PBS containing Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) (1:500) (Invitrogen, USA). After 10 min of incubation, fluorescence was monitored during 160 min using Thyphoon FLA 9000 laser scanner (GE Healthcare Life Sciences, USA) and quantified by ImageQuant TL software (GE Healthcare Life Sciences, USA). Bacterial counts were obtained at the beginning and at the end of the experiment to ensure that metabolites mixture was not presenting bactericidal activity against *A. baumannii* and *E. coli* strains.

Statistical analysis

Group data are presented as means ± standard errors of the means (SEM). For *in vitro* studies, the Student t test was used to determine differences between means. Differences in bacterial spleen, lung and blood concentrations (mean ± SEM log₁₀ CFU per g or mL) were assessed by analysis of variance (ANOVA) and post-hoc Dunnett's and Tukey's tests. Differences in mortality (%) between groups were compared by use of the χ^2 test. *P* values of <0.05 were considered significant. The SPSS (version 21.0; SPSS Inc.) statistical package was used.

Acknowledgments: We thank Dr. José Manuel Rodríguez Martínez for the kind gift of the EcMCR⁺ strain.

Funding: This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Proyectos de Investigación en Salud (grants CP15/00132, PI16/01378 and PI19/01453) and by Plan Nacional de I+D+i 2013- 2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General

CAPÍTULO I. Artículo 2

de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0009) - co- financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe”, Operative program Intelligent Growth 2014- 2020. Younes Smani is supported by the Subprograma Miguel 301 Servet Tipo I from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (CP15/00132).

Author contributions: R.T., J.P., Y.S. conceived the study and designed the experiments. A.M.C., R.A.A, R.T, performed experiments and interpreted data. J.P. and Y.S. wrote the manuscript with the input of all the other authors.

Competing interests: No conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. Rasko DV, Sperandio V. 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat Rev Drug Discov* 9:117-128.
2. Vila-Farrés X, Parra-Millán R, Sánchez-Encinales V, Varese M, Ayerbe-Algaba R, Bayó N, Guardiola S, Pachón-Ibáñez ME, Kotev M, García J, Teixidó M, Vila J, Pachón J, Giralt E, Smani Y. 2017. Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. *Sci Rep* 7:14683.
3. Smani Y, Domínguez-Herrera J, Ibáñez-Martínez J, Pachón J. 2015. Therapeutic efficacy of lysophosphatidylcholine in severe infections caused by *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 59:3920-3924.
4. Wright GD. 2016. Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance. *Trends Microbiol* 24:862-871.
5. Parra Millán R, Jiménez Mejías ME, Sánchez Encinales V, Ayerbe Algaba R, Gutiérrez Valencia A, Pachón Ibáñez ME, Díaz C, Pérez Del Palacio J, López Cortés LF, Pachón J, Smani Y. 2016. Efficacy of lysophosphatidylcholine in combination with antimicrobial agents against *Acinetobacter baumannii* in experimental murine peritoneal sepsis and pneumonia models. *Antimicrob Agents Chemother* 60:4464-4470.
6. Miyazaki H, Midorikawa N, Fujimoto S, Miyoshi N, Yoshida H, Matsumoto T. 2017. Antimicrobial effects of lysophosphatidylcholine on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ther Adv Infect Dis* 4:89-94.

CAPÍTULO I. Artículo 2

7. Zhao L, KuoLee R, Harris G, Tram K, Yan H, Chen W. 2011. c-di-GMP protects against intranasal *Acinetobacter baumannii* infection in mice by chemokine induction and enhanced neutrophil recruitment. *Int Immunopharmacol* 11:1378-1383.
8. Nathan C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6:173-182.
9. Shi C, Pamer EG. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11:762-774.
10. Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, Leiner I, Li MO, Frenette PS, Pamer EG. 2011. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity* 34:590-601.
11. Yoo JK, Kwon H, Khil LY, Zhang L, Jun HS, Yoon JW. 2005. IL-18 induces monocyte chemotactic protein-1 production in macrophages through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and MEK/ERK1/2 pathways. *J Immunol* 175:8280-8286.
12. Bossink AW, Paemen L, Jansen PM, Hack CE, Thijs LG, Van Damme J. 1995. Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant proteins-1 and -2 are elevated in human sepsis. *Blood* 86:3841-3847.
13. Yong KK, Chang JH, Chien MH, Tsao SM, Yu MC, Bai KJ, Tsao TC, Yang SF. 2016 Plasma monocyte chemoattractant protein-1 level as a predictor of the severity of community-acquired pneumonia. *Int J Mol Sci* 17. pii: E179.
14. Behjati S, Frank MH. 2009. The effects of tamoxifen on immunity. *Curr Med Chem* 16: 3076-3080.
15. Seli E, Pehlivan T, Selam B, Garcia-Velasco JA, Arici A. 2002. Estradiol down-regulates MCP-1 expression in human coronary artery endothelial cells. *Fertil Steril* 77:542-547.
16. Wang L, Zheng W, Zhang S, Chen X, Hornung D. 2006. Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human endometrial cancer cells and the effect of treatment with tamoxifen or buserelin. *J Int Med Res* 34:284-290.
17. Jang WS, Kim S, Podder B, Jyoti MA, Nam KW, Lee BE, Song HY. 2015. Anti-mycobacterial activity of tamoxifen against drug-resistant and intra-macrophage *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Biotechnol* 25:946-950.

CAPÍTULO I. Artículo 2

18. Jacobs AC, Didone L, Jobson J, Sofia MK, Krysan D, Dunman PM. 2013. Adenylate kinase release as a high-throughput-screening-compatible reporter of bacterial lysis for identification of antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 57:26-36.
19. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. 2017. Polymyxins: Antibacterial Activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev* 30:557-596.
20. Hoskins JM, Carey LA, McLeod HL. 2009. CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 9:576-586.
21. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325:612-616.
22. Robbins CS, Chudnovskiy A, Rauch PJ, Figueiredo JL, Iwamoto Y, Gorbатов R, Etzrodt M, Weber GF, Ueno T, van Rooijen N, Mulligan-Kehoe MJ, Libby P, Nahrendorf M, Pittet MJ, Weissleder R, Swirski FK. 2012. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation* 125:364-374.
23. Handel TM, Johnson Z, Crown SE, Lau EK, Proudfoot AE. 2005. Regulation of protein function by glycosaminoglycans-as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem* 74:385-410.
24. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29:313-326.
25. Corriden R, Hollands A, Olson J, Derieux J, Lopez J, Chang JT, Gonzalez DJ, Nizet V. 2015. Tamoxifen augments the innate immune function of neutrophils through modulation of intracellular ceramide. *Nat Commun* 6:8369.
26. Yu M, Jiang M, Chen Y, Zhang S, Zhang W, Yang X, Li X, Li Y, Duan S, Han J, Duan Y. 2016. Inhibition of macrophage CD36 expression and cellular oxidized low density lipoprotein (oxLDL) accumulation by tamoxifen: a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma-dependent mechanism. *J Biol Chem* 291:16977-16989.
27. Luo G, Spellberg B, Gebremariam T, Bolaris M, Lee H, Fu Y, French SW, Ibrahim AS. 2012. Diabetic murine models for *Acinetobacter baumannii* infection. *J Antimicrob Chemother* 67:1439-1445.

CAPÍTULO I. Artículo 2

28. Pletzer D, Mansour SC, Wuerth K, Rahanjam N, Hancock RE. 2017. New mouse model for chronic infections by Gram-negative bacteria enabling the study of anti-infective efficacy and host-microbe interactions. *mBio* 8:e00140-17.
29. Zuluaga AF, Salazar BE, Rodriguez CA, Zapata AX, Agudelo M, Vesga O. 2006. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect Dis* 6:55.
30. Miro-Canturri A, Ayerbe-Algaba R, Smani Y. 2019. Drugs repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. *Front. Microbiol.* 10:41.
31. Ashburn TT, Thor KB 2004. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 3:673-683.
32. Serbina NV, Hohl TM, Cherny M, Pamer EG. 2009. Selective expansion of the monocytic lineage directed by bacterial infection. *J. Immunol.* 183:1900-1910.
33. Serbina NV, Kuziel W, Flavell R, Akira S, Rollins B, Pamer EG. 2003. Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. *Immunity* 19:891-901.
34. Balamayooran G, Batra S, Balamayooran T, Cai S, Jeyaseelan S. 2011. Monocyte chemoattractant protein 1 regulates pulmonary host defense via neutrophil recruitment during *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 79:2567-2577.
35. Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, Pamer EG. 2008. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 180:6846-6853.
36. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Inv* 117:902-909.
37. Burdon PC, Martin C, Rankin SM. 2005. The CXC chemokine MIP-2 stimulates neutrophil mobilization from the rat bone marrow in a CD49d-dependent manner. *Blood* 105:2543-2548.
38. Rankin SM. 2010. The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leuk. Biol* 88:241-251.
39. Dominguez PM, Ardavin C. 2010. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev* 234:90-104.

CAPÍTULO I. Artículo 2

40. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19:59-70.
41. Bosschaerts T, Guilliams M, Stijlemans B, Morias Y, Engel D, Tacke F, Hérin M, De Baetselier P, Beschin A. 2010. Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling. *PLoS Pathog* 6: e1001045.
42. Nalbandian G, Paharkova-Vatchkova V, Mao A, Nale S, Kovats S. 2005. The selective estrogen receptor modulators, tamoxifen and raloxifene, impair dendritic cell differentiation and activation. *J Immunol* 175:2666-2675.
43. Smani Y, Docobo-Pérez F, López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, Ibáñez-Martínez J, Pachón J. 2012. Platelet-activating factor receptor initiates contact of *Acinetobacter baumannii* expressing phosphorylcholine with host cells. *J Biol Chem* 287:26901-26910.
44. Parra-Millán R, Guerrero-Gómez D, Ayerbe-Algaba R, Pachón-Ibáñez ME, Miranda-Vizueté A, Pachón J, Smani Y. 2018. Intracellular trafficking and persistence of *Acinetobacter baumannii* requires transcription factor EB. *mSphere* 3:e00106-18.
45. Baumann P, Doudoroff M, Stanier MR. 1968. A 377 study of the Moraxella group. II. Oxidative negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol* 95:1520-1541.
46. Holloway IW. 1955. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 13:572-681.
47. *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 25922™). 1946. FDA strain Seattle [DSM 1103, NCIB 12210].
48. Peña C, Suarez C, Gozalo M, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez F, Tubau F, Martínez-Martínez L, Oliver A. 2012. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1265-1272.
49. Ayerbe Algaba R, Álvarez-Marín R, Praena J, Smani Y. 2019. *Escherichia coli* causing meningitis in an adult: A case report and experimental characterization of its virulence. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 37:418-419.

CAPÍTULO I. Artículo 2

50. Yanat B, Machuca J, Yahia RD, Touati A, Pascual Á, Rodríguez-Martínez JM. 2016. First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate in Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 48:760-761.
51. Fernández-Cuenca F, Tomás-Carmona M, Caballero-Moyano F, Bou G, Martínez-Martínez L, Vila J, Pachón J, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pascual A. 2012. *In vitro* activity of 18 antimicrobial agents against clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: multicenter national study GEIH-REIPI-Ab 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 31:4-9.
52. Rodriguez Villodres A, Alvarez Marín R, Durán Lobato M, Pachón Ibáñez ME, Aznar J, Pachón Díaz J, Lepe JA, Smani Y. Overexpression of outer membrane protein A by *Escherichia coli* as a risk factor for mortality in bloodstream infection, presented at the 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, Netherlands, 13 to 16 April 2019.
53. Del Toro R, Chèvre R, Rodríguez C, Ordóñez A, Martínez-González J, Andrés V, Méndez-Ferrer S. 2016. Nestin+ cells direct inflammatory cell migration in atherosclerosis. *Nat Commun* 7:12706.
54. Gil-Marqués ML, Pachón-Ibáñez ME, Pachón J, Smani Y. 2018. Effect of hypoxia on the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and in murine experimental models of infection. *Infect Immun* 86:e00543-18.
55. Dong G, Song L, Tian C, Wang Y, Miao F, Zheng J, Lu C, Alsadun S, Graves DT. 2017. FOXO1 regulates bacteria-induced neutrophil activity. *Front Immunol* 4:8:1088.
56. Maekawa T, Krauss JL, Abe T, Jotwani R, Triantafilou M, Triantafilou K, Hashim A, Hoch S, Curtis MA, Nussbaum G, Lambris JD, Hajishengallis G. 2014. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. *Cell Host Microbe* 15(6):768-78.
57. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (Twenty-Seventh Informational Supplement M100-S27. CLSI, Wayne, PA, USA, 2017).

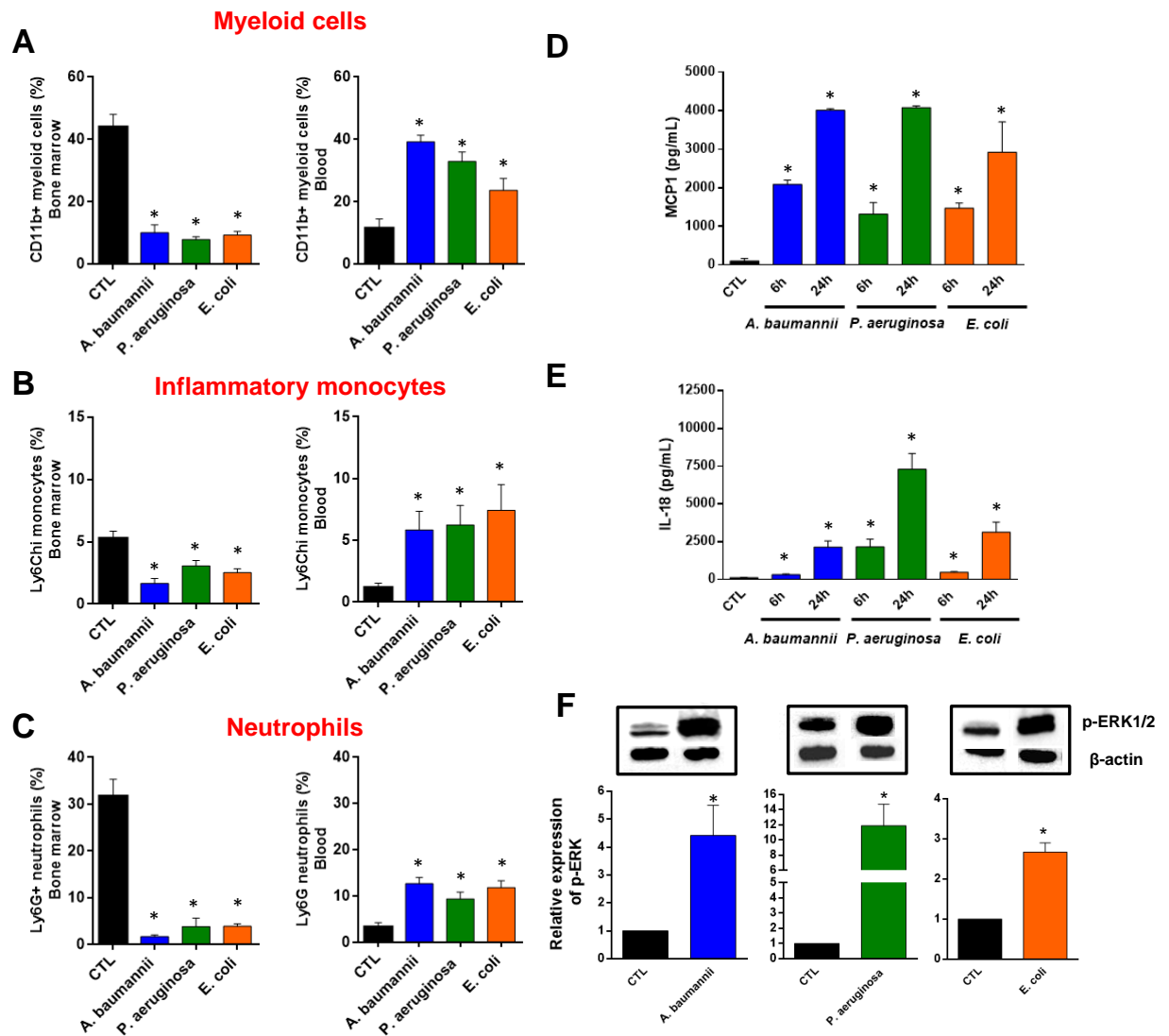


Figure 1. Bone marrow immune cells migration to blood in response to MCP-1 and IL-18 during bacterial infection. (A) Myeloid cells, (B) inflammatory monocytes and (C) neutrophils were identified as CD11b+, CD11b+Ly6Chi and CD11b+Ly6G+ by flow cytometry, respectively, in bone marrow and blood of mice infected with MLD100 of *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains for 24h. (D and E) Serum MCP-1 and IL-18 levels (ELISA assays), 6 and 24 h post-infection, in mice infected with minimal lethal dose 100 (MLD100) of *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains. (F) RAW 264.7 cells were infected with *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains for 2 h and proteins were collected for Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) and β -actin immunoblotting. Data are representative of six mice per group, and expressed as mean \pm SEM. * P <0.05: infected vs. CTL. CTL: non-infected mice.

CAPÍTULO I. Artículo 2

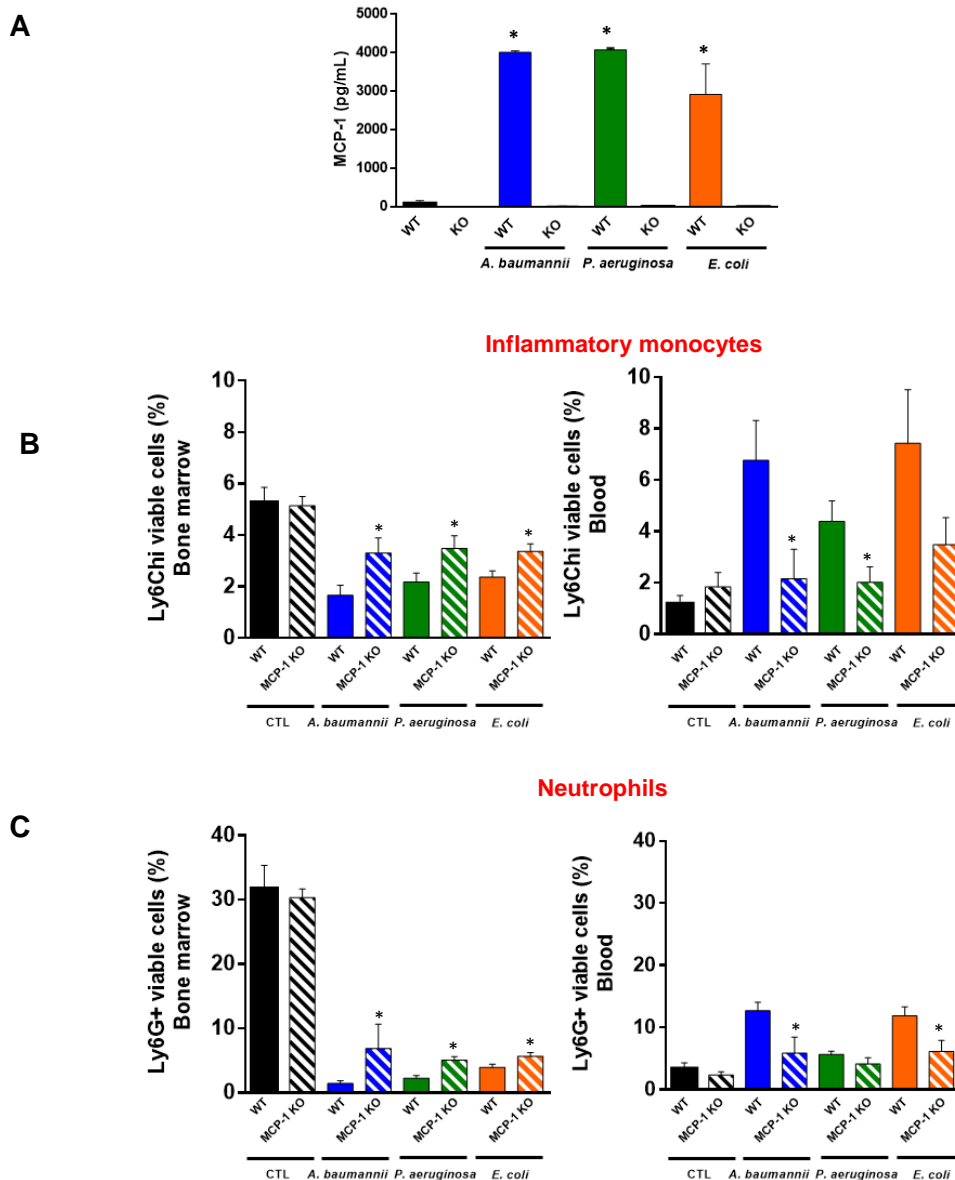


Figure 2. Role of MCP-1 in the bone marrow immune cells migration to blood during bacterial infection. (A) Wild-type and MCP-1 KO mice were infected with minimal lethal dose 100 (MLD100) of *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains. Twenty-four hours post-infection, serum was harvested for MCP-1 ELISA assays. (B) Inflammatory monocytes, and (C) neutrophils were identified as CD11b+Ly6Chi and CD11b+Ly6G+ by flow cytometry, respectively, in bone marrow and blood of wild-type and MCP-1 KO mice infected with MLD100 of *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains for 24 h. Data are representative of six mice per group, and expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$: WT vs. MCP-1 KO. WT: wild-type, MCP-1 KO: mice lacking MCP-1, CTL: non-infected mice.

CAPÍTULO I. Artículo 2

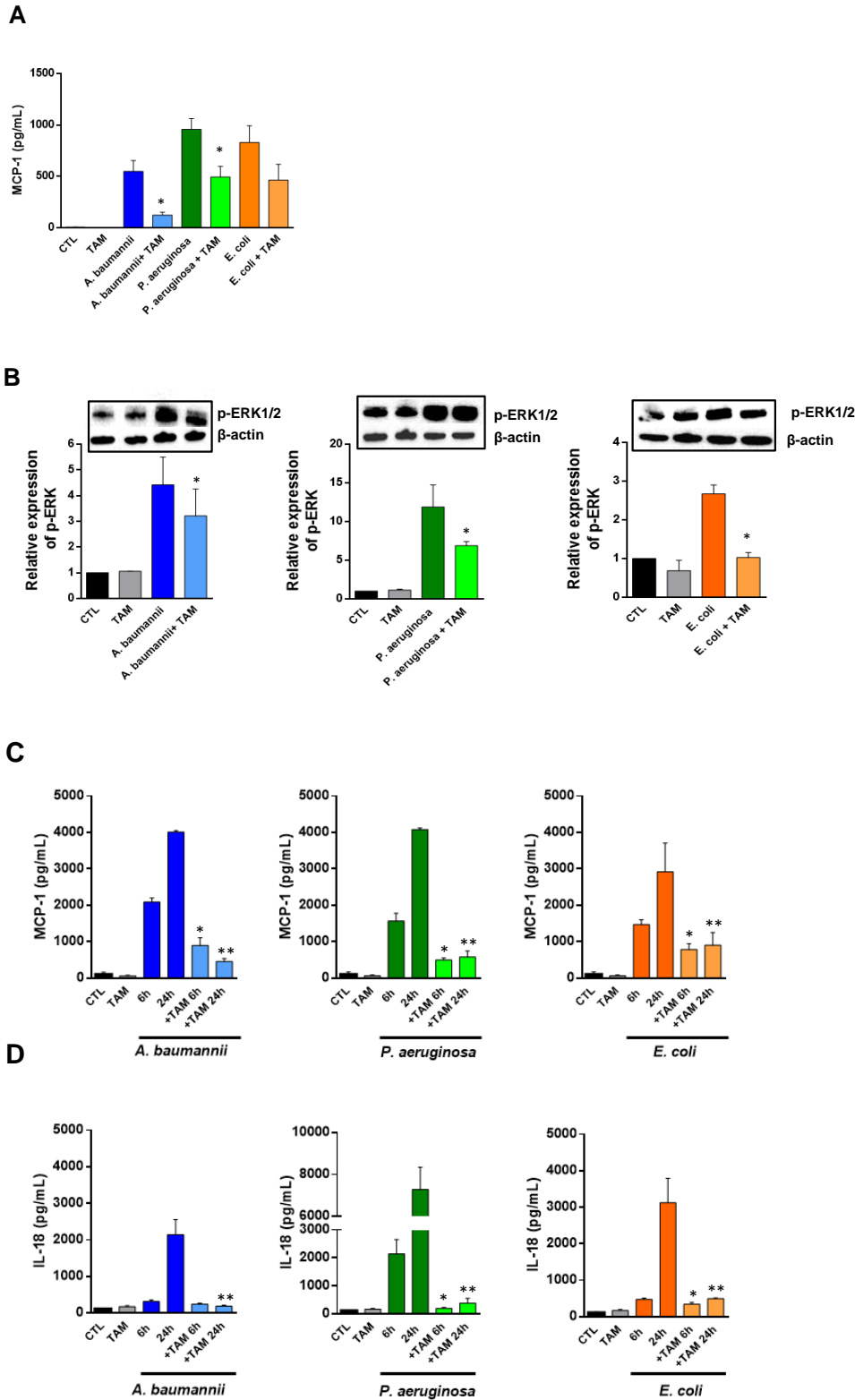


Figure 3. Tamoxifen reduces, after bacterial infection, the release of MCP-1 and IL-18 *in vitro* and *in vivo*, and the ERK phosphorylation *in vitro*. (A and B) RAW 264.7 cells were treated with 2.5 mg/L of tamoxifen for 24 h and infected with *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains for 2 h.

CAPÍTULO I. Artículo 2

MCP-1 levels and ERK-phosphorylation were determined by ELISA and immunoblotting assays, respectively. Data are representative of three independent experiments, and expressed as mean \pm SEM. (C and D) Mice received tamoxifen (80 mg/kg/d, for 3 days) and infected with minimal lethal dose 100 (MLD100) of *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains. Six and twenty-four hours post-infection, serum was harvested for MCP-1 and IL-18 ELISA assays. Data are representative of 6 mice per group and are expressed as mean \pm SEM. * P <0.05: treated vs. CTL, ** P <0.05: treated vs. CTL. CTL: non-infected mice. TAM: tamoxifen.

CAPÍTULO I. Artículo 2

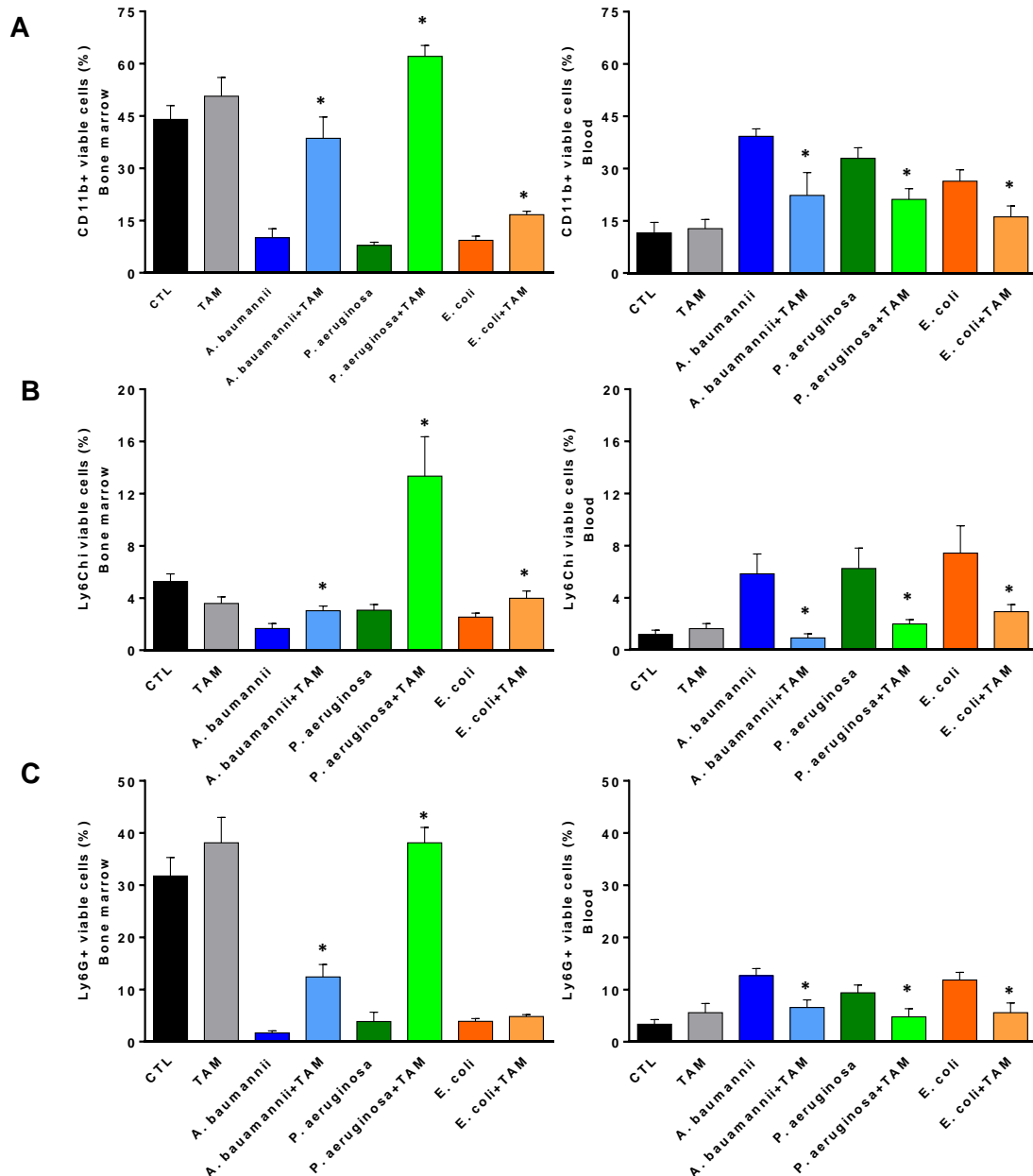


Figure 4. Tamoxifen impairs, after bacterial infection, the migration of immune cells from bone marrow to blood through MCP-1 regulation. Mice received tamoxifen (80 mg/kg/d, for 3 days) and infected with minimal lethal dose 100 of *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains. Twenty-four hours post-infection, (A) myeloid cells, (B) inflammatory monocytes and (C) neutrophils were identified as CD11b+, CD11b+Ly6Chi and CD11b+Ly6G+ by flow cytometry, respectively, in bone marrow and blood of mice. Data are representative of 6 mice per group and are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$: treated vs. CTL. CTL: non-infected mice, TAM: tamoxifen.

CAPÍTULO I. Artículo 2

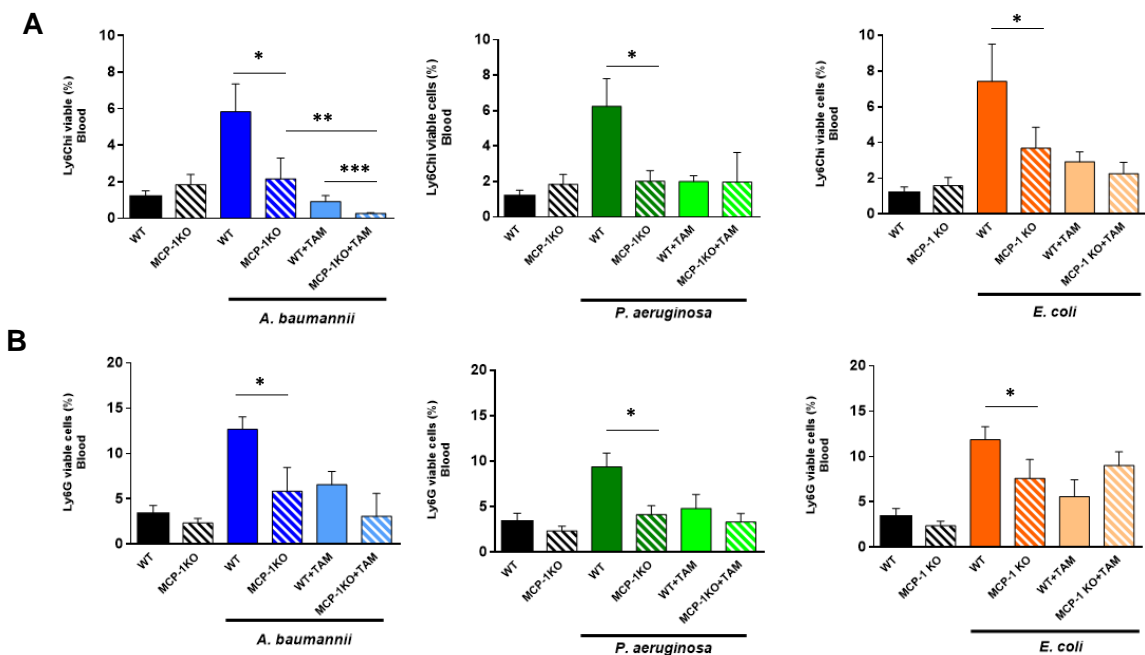


Figure 5. Tamoxifen impairs, after bacterial infection in mice MCP-1-deficient, the migration of immune cells from bone marrow to blood through MCP-1 regulation. (A) WT and MCP-1 KO mice received tamoxifen (80 mg/kg/d, for 3 days) and infected with minimal lethal dose 100 of *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains. Twenty-four hours post-infection, (A) inflammatory monocytes and (B) neutrophils were identified as CD11b+, CD11b+Ly6Chi and CD11b+Ly6G+ by flow cytometry, respectively, in bone marrow and blood of mice. Data are representative of 6 mice per group and are expressed as mean \pm SEM. CTL: non-infected mice. * $P < 0.05$: infected WT vs. infected MCP-1 KO, ** $P < 0.05$: infected MCP-1 KO vs. infected MCP-1 KO + TAM, *** $P < 0.05$: infected WT + TAM vs. infected MCP-1 KO + TAM. CTL: non-infected mice, TAM: tamoxifen.

CAPÍTULO I. Artículo 2

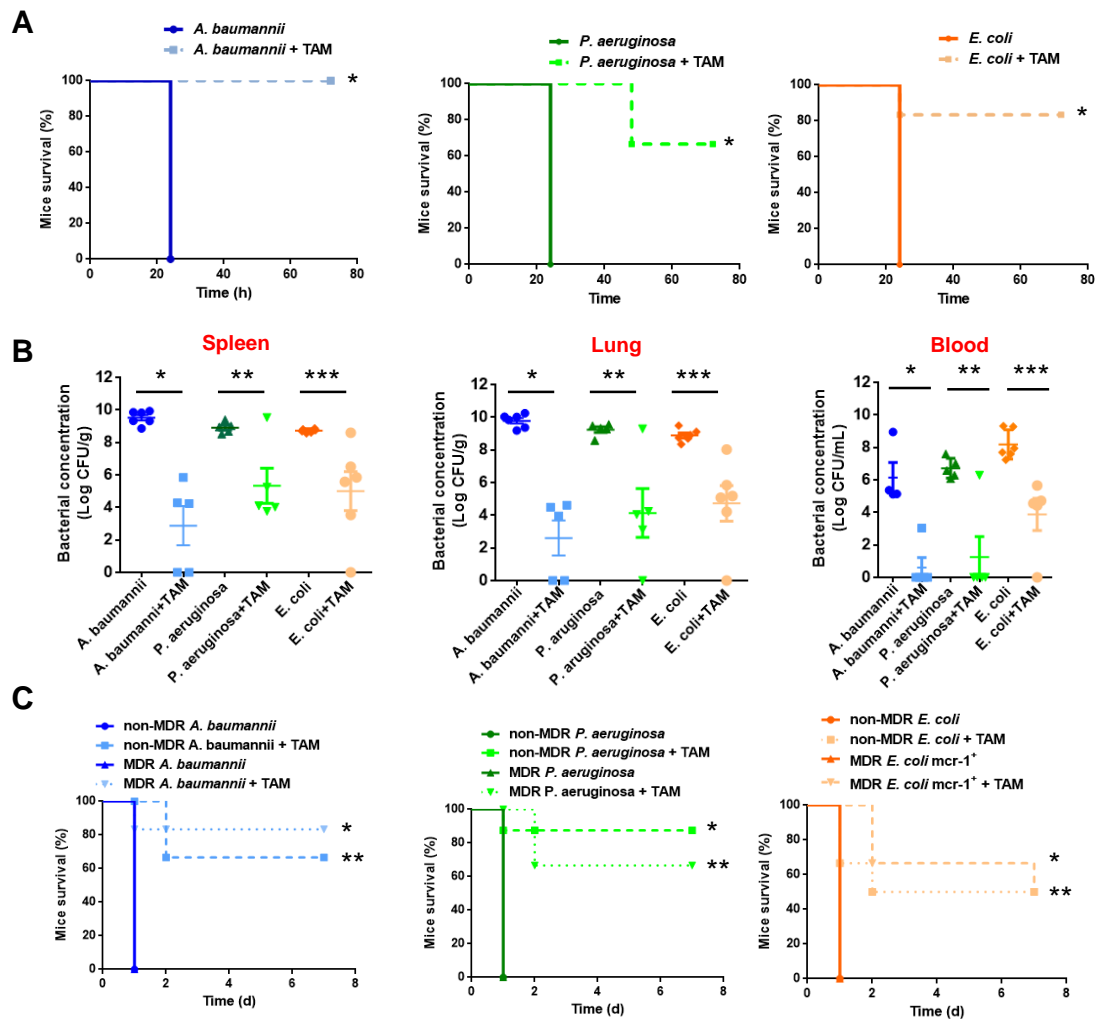


Figure 6. Tamoxifen shows therapeutic efficacy in murine sepsis models by GNB.

(A) Mice survival was monitored during 3 days for mice infected with minimal lethal dose 100 (MLD100) of *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains treated or not with 3 i.p. doses of tamoxifen (80 mg/kg/d, for 3 days). (B) Bacterial burden in spleen, lung and blood of mice treated or not with 3 ip. doses of tamoxifen (80 mg/kg/d, for 3 days), and infected with MLD100 of *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains. (C) Mice survival was monitored during 7 days for 6 mice infected with MLD100 of non-MDR and MDR *A. baumannii* (Ab9 and Ab186), *P. aeruginosa* (Pa39 and Pa238) or *E. coli* (C1-7-LE and EcMCR+) strains treated or not with 3 i.p. doses of tamoxifen (80 mg/kg/d, for 3 days). * $P < 0.05$: treated vs. untreated, ** $P < 0.05$: treated vs. untreated, *** $P < 0.05$: treated vs. untreated. TAM: tamoxifen, MDR: multidrug-resistant.

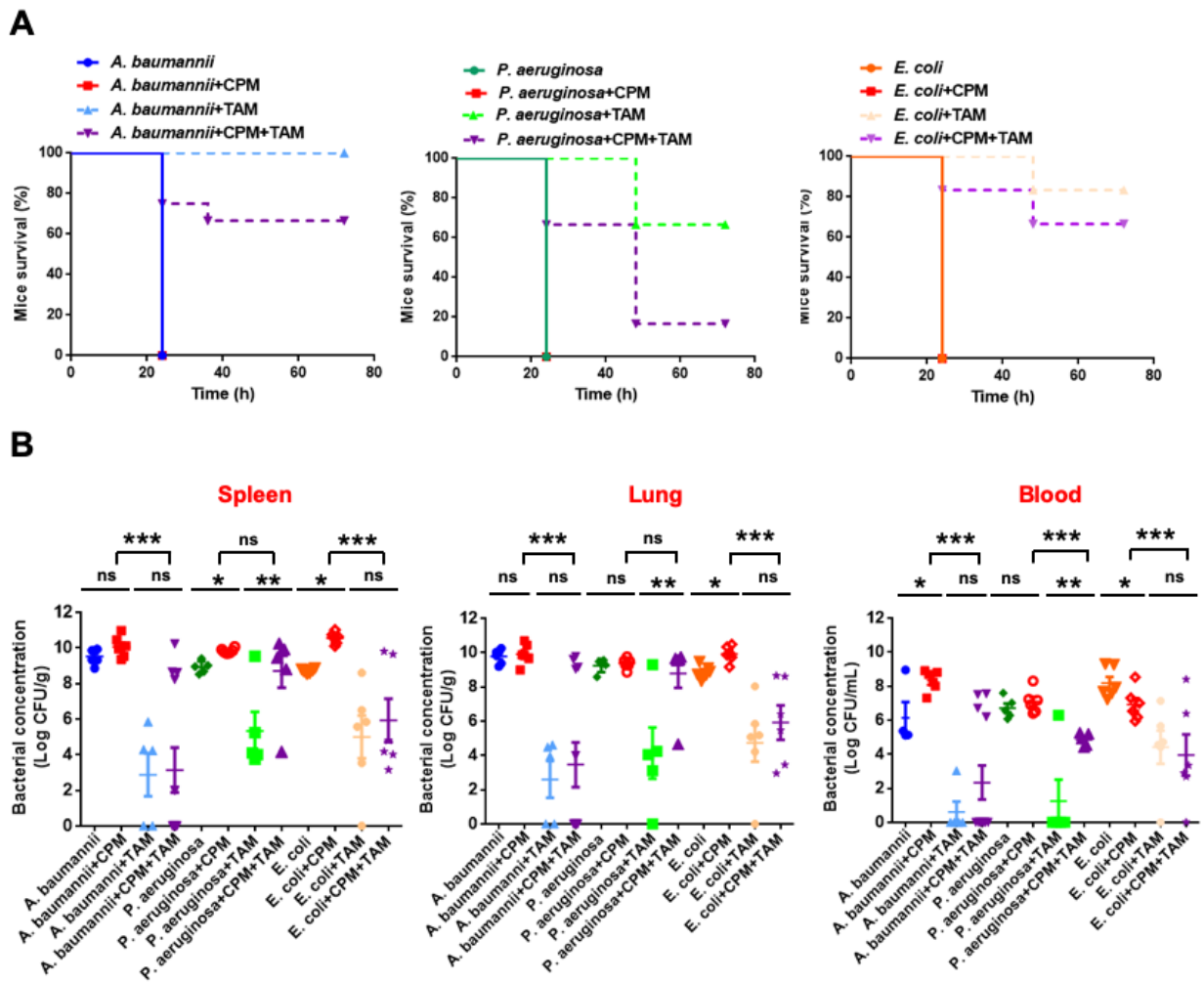


Figure 7. Immunosuppressed mice respond to TAM treatment. (A) Mice survival was monitored during 3 days for immunocompetent and neutropenic mice, induced by cyclophosphamide, infected with MLD100 of *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains treated or not with 3 ip. doses of tamoxifen (80 mg/kg/d, for 3 days). (B) Bacterial burden in tissues and blood of immunocompetent and neutropenic mice treated or not with 3 i.p. doses of tamoxifen (80 mg/kg/d, for 3 days), and infected with MLD100 of *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains. * $P < 0.05$: bacteria vs. bacteria + CPM, ** $P < 0.05$: bacteria + TAM vs. bacteria + CPM + TAM, *** $P < 0.05$: bacteria + CPM vs. bacteria + CPM + TAM. CPM: cyclophosphamide, TAM: tamoxifen. ns: non-significant.

CAPÍTULO I. Artículo 2

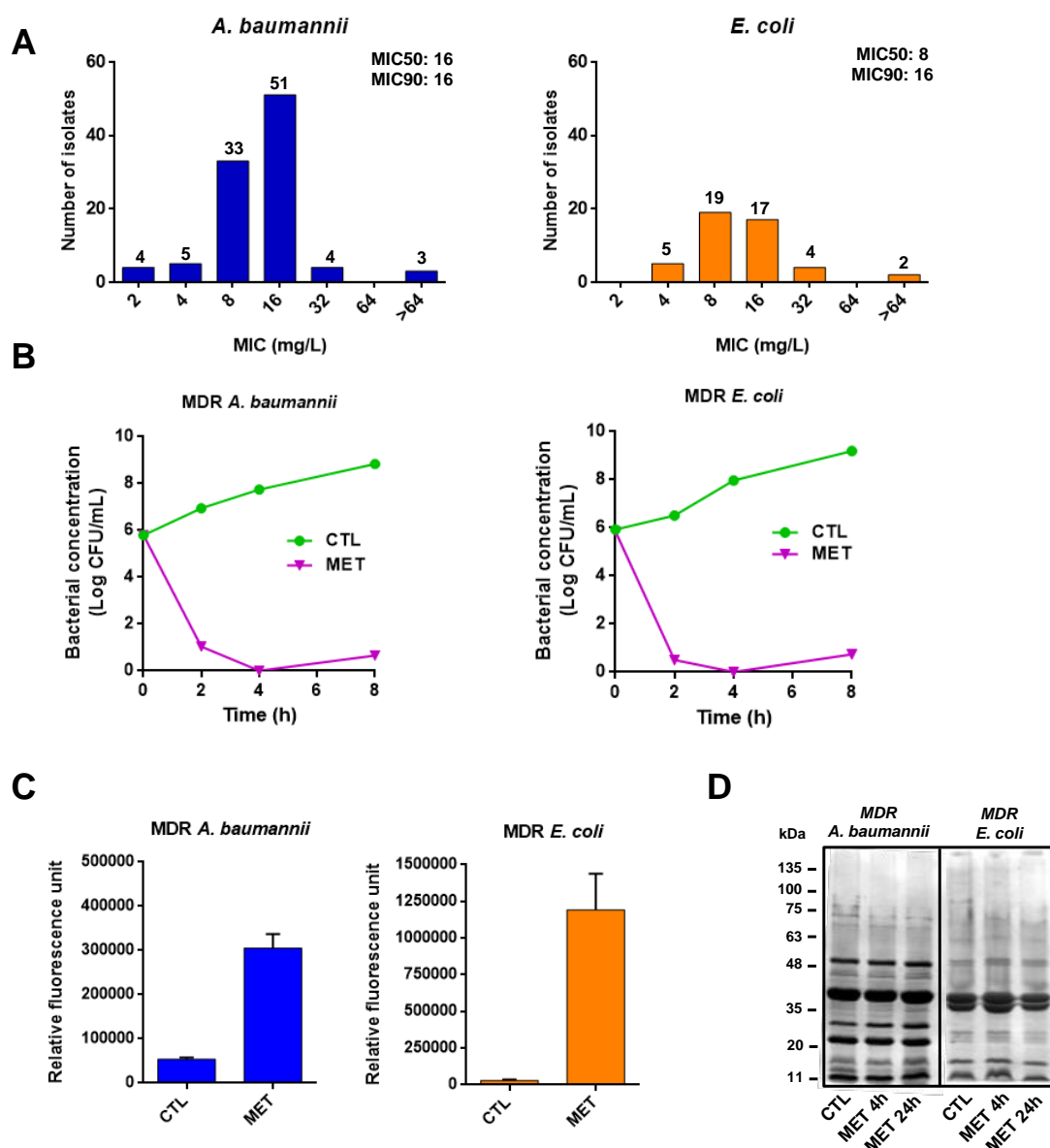


Figure 8. Tamoxifen metabolites present antibacterial activity targeting the bacterial membrane. (A) Histogram distribution of MIC for the three tamoxifen metabolites mixture against a collection of *A. baumannii* and *E. coli*. (B) Time–kill curves of the MDR *A. baumannii* Ab186 and *E. coli* EcMCR⁺ strains alone and in the presence of metabolites mixture (4xMIC) for 8 h. (C) Tamoxifen metabolites effect on the bacterial permeability. The membrane permeabilization of MDR *A. baumannii* Ab186 and *E. coli* EcMCR⁺ strains in absence and presence of tamoxifen metabolites (2 and 16 mg/L, respectively) incubated for 24 h, was quantified by Typhon Scanner. (D) SDS–PAGE of the outer membrane proteins of MDR *A. baumannii* Ab186 and *E. coli* EcMCR⁺ strains with or without tamoxifen metabolites (2 and 16 mg/L, respectively). MET: The three tamoxifen metabolites together. CTL: control.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

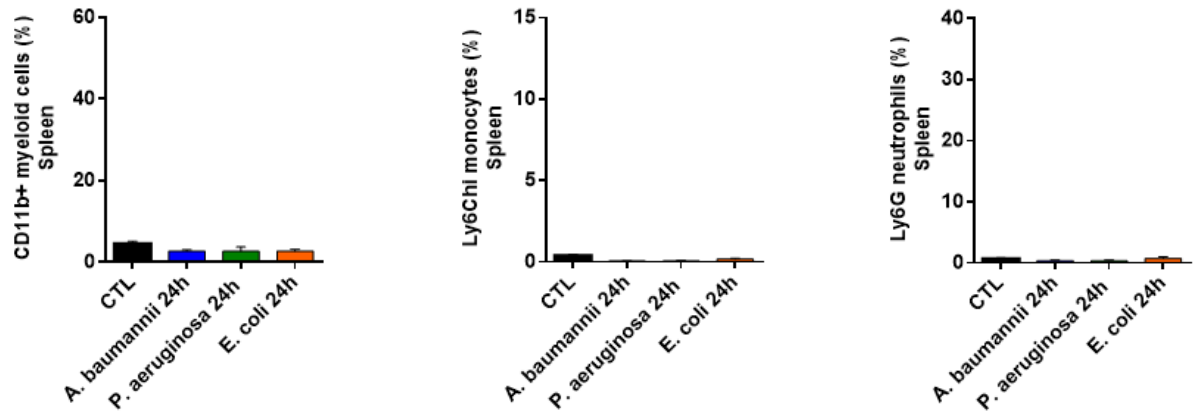


Figure S1. Bone marrow immune cells migration to spleen during bacterial infection. Myeloid cells, inflammatory monocytes and neutrophils were identified as CD11b+, CD11b+Ly6Chi and CD11b+Ly6G+ by flow cytometry, respectively, in spleen of mice infected with MLD100 of *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains for 24h. Data are representative of 6 mice per group and are expressed as mean \pm SEM. CTL: non-infected mice.

CAPÍTULO I. Artículo 2

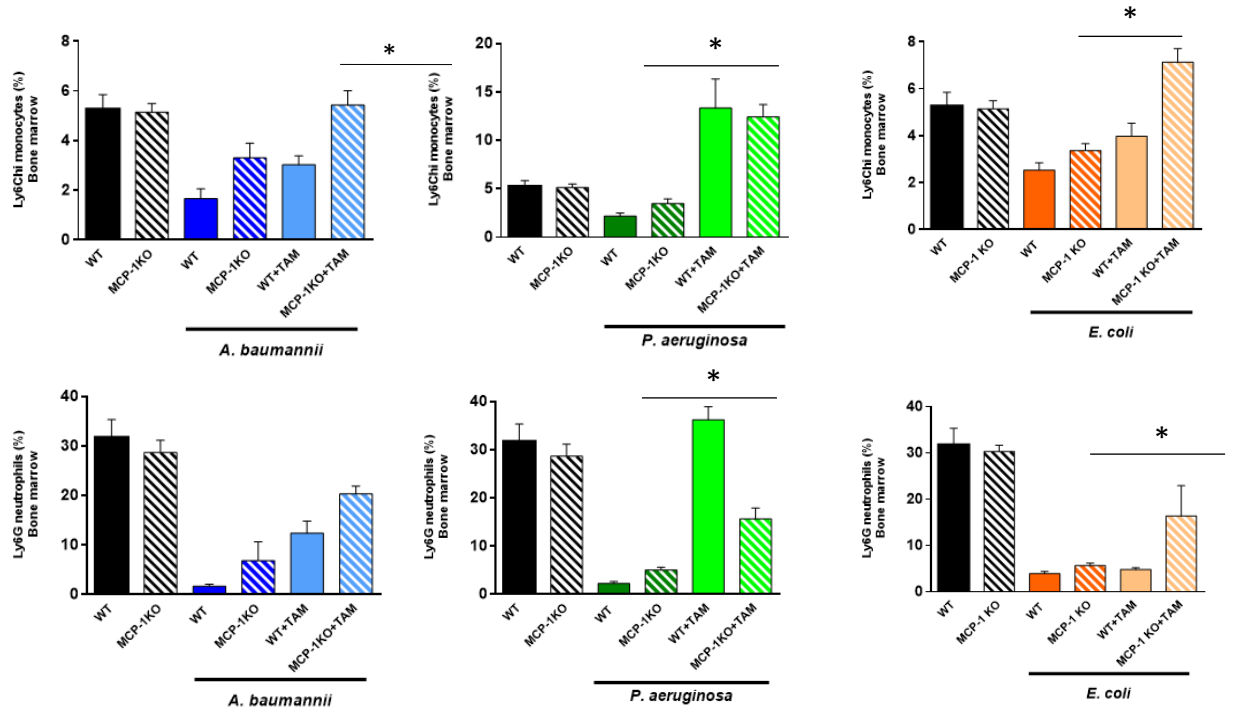


Figure S2. Role of MCP-1 in the bone marrow immune cells migration to blood during bacterial infection. Inflammatory monocytes and neutrophils were identified as CD11b+Ly6Chi and CD11b+Ly6G+ by flow cytometry, respectively, in bone marrow of WT and MCP-1 KO mice infected with MLD100 of *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli* ATCC25922 strains for 24 h. Data are representative of six mice per group, and expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$: MCP-1 KO+TAM vs. MCP-1 KO. WT: wild-type, MCP-1 KO: mice lacking MCP-1. CTL: non-infected mice.

CAPÍTULO I. Artículo 2

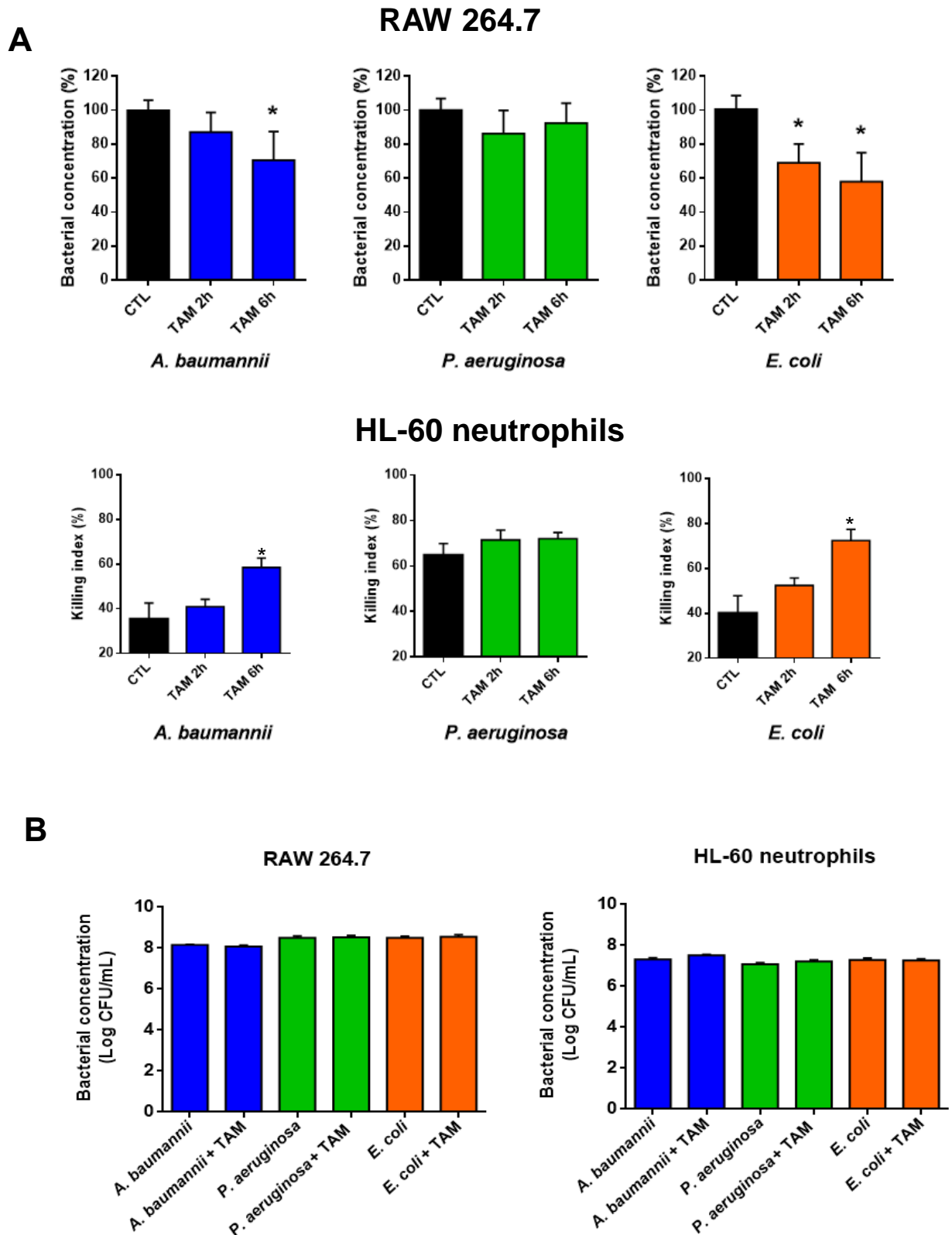


Figure S3. Tamoxifen induces phagocytic activity of macrophages and neutrophils. RAW 264.7 cells and HL-60 neutrophils were incubated with tamoxifen for 2 and 6h and infected for 2 h with *A. baumannii* ATCC17978, *P. aeruginosa* PAO1 or *E. coli*

CAPÍTULO I. Artículo 2

ATCC25922 strains (MOI:100) (A) The adherence and invasion of these strains are expressed as the percentage of total control strain adhered or internalized to RAW 264.7 and the killing index of HL-60 neutrophil cells is expressed as the percentage. (B) The extracellular strains in the culture medium are determined as Log CFU/ml. Data are representative of three independent experiments, and expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$: treated vs. CTL. CTL: infected mice without tamoxifen treatment. TAM: tamoxifen.

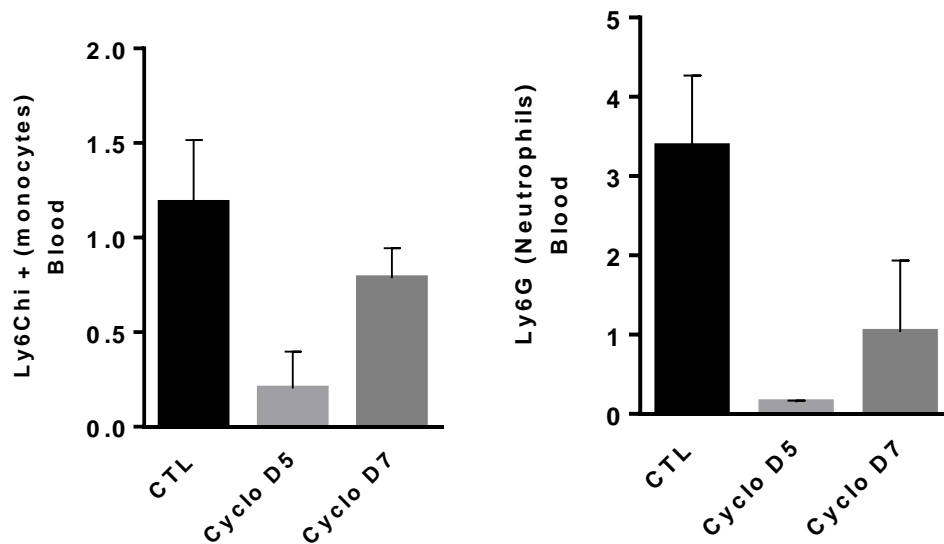


Figure S4. Immune cells percentages in immunosuppressed mice. Inflammatory monocytes and neutrophils were identified as CD11b+Ly6Chi and CD11b+Ly6G+ by flow cytometry, respectively, in blood of neutropenic mice.

CAPÍTULO II

Reposicionamiento de la rafoxanida como
tratamiento antimicrobiano

CAPÍTULO II. Artículo 3

2.1 Artículo 3. *Repositioning rafoxanide drug to treat Gram-negative bacilli infections.*

El aumento de la resistencia a gran parte de los antibióticos encontrada en aislados clínicos de BGN incluyendo *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* ha impulsado el uso de antiguos antibióticos como la colistina que habían quedado en desuso. Sin embargo, en los últimos años, el aumento de resistencia a este antibiótico en algunos países se ha convertido en una realidad alarmante. Por esta razón, existe una necesidad urgente de búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas con el objeto de mejorar el tratamiento de infecciones bacterianas. En este contexto, surge el concepto de reposicionamiento de fármacos, centrado en encontrar una nueva indicación para fármacos que se están usando en la práctica clínica. Su uso puede estar indicado como monoterapia o bien en terapia combinada con antibióticos como la colistina, con la finalidad de restaurar su actividad. Por consiguiente, el objetivo principal de este estudio fue analizar la actividad de la rafoxanida, fármaco usado en veterinaria para tratar infecciones por trematodos, en combinación con colistina frente a cepas sensibles a colistina (Col-S) y cepas resistentes a colistina (Col-R) de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.

Mediante ensayo de microdilución se determinaron las CMI's de colistina y rafoxanida de cada una de las cepas y la sinergia entre ambos fármacos se evaluó mediante ensayos de tablero de ajedrez y curvas tiempo-muerte. Con la finalidad de conocer el mecanismo de acción, se realizaron ensayos de permeabilidad de membrana mediante fluorescencia, se analizaron cambios en la morfología bacteriana usando microscopía electrónica de transmisión, se realizaron ensayos de potencial Z con el fin de determinar si se producían cambios en la carga neta de la superficie bacteriana, se cuantificó la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por último, se estudió el perfil de las OMPs usando electroforesis SDS-PAGE. Además, usando modelos de sepsis peritoneal murinos (inmunodeprimidos e inmunocompetentes) se evaluó *in vivo* la actividad tanto de la rafoxanida como la colistina en monoterapia, así como en terapia combinada, frente a cepas Col-R de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.

Los ensayos de microdilución mostraron que la rafoxanida *in vitro* no presenta actividad frente a ninguna de las cepas bacterianas estudiadas. Tanto los ensayos de tablero de ajedrez como las curvas tiempo-muerte mostraron que la combinación de colistina y rafoxanida presentó un efecto sinérgico en *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K.*

CAPÍTULO II. Artículo 3

pneumoniae, siendo más acentuado en las cepas Col-R. En consecuencia, las cepas Col-R presentaron un mayor aumento de la permeabilidad de membrana y sufrieron cambios morfológicos que indicaban pérdida de la integridad de esta estructura. En el caso de *A. baumannii* y *K. pneumoniae*, también se observó un aumento de la carga negativa en la superficie de membrana, cambio no observado en *P. aeruginosa*. Estas modificaciones estructurales y de permeabilidad no afectaron al perfil de OMPs ni tampoco se observó un aumento en la liberación de ROS por parte de las cepas de estudio. Por lo tanto, el mecanismo *in vitro* mediante el cual la rafoxanida aumenta la sensibilidad frente a colistina parece ser el aumento de la permeabilidad de membrana, así como el aumento de cargas negativas en la superficie bacteriana que permiten que la colistina, un péptido cargado positivamente, se una con más afinidad. En cuanto a los resultados *in vivo*, como era de esperar, la colistina en monoterapia no presentó ninguna actividad debido a que las cepas de estudio de los tres patógenos eran resistentes. La terapia combinada aumentó la supervivencia animal entre el 54% y el 74%, y redujo la carga bacteriana en tejidos y sangre. Inesperadamente, aunque la rafoxanida no presentó actividad antibacteriana *in vitro*, la monoterapia con rafoxanida también presentó actividad frente a las cepas estudiadas con valores similares a los obtenidos para la combinación de ambos fármacos. Estudios realizados en ratones inmunodeprimidos (con bajos niveles de monocitos, neutrófilos y células dendríticas circulantes) mostraron que aunque éstos hayan recibido tratamiento con rafoxanida, no son capaces de resolver la infección, hecho que sugiere que las células de la inmunidad innata son necesarias para la actividad *in vivo* de este fármaco.

Por todo ello, la rafoxanida puede ser un buen candidato a reposicionar tanto en monoterapia como en combinación con colistina en infecciones causadas por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* Col-R.

El manuscrito resultante de este trabajo ha sido publicado en la revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Repositioning rafoxanide to treat Gram-negative bacilli infections

Andrea Miró-Canturri^{1,2}, Rafael Ayerbe-Algaba^{1,2}, Ángel Rodríguez Villodres^{1,2}, Jerónimo Pachón^{2,3} and Younes Smani^{1,2*}

¹Clinical Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain; ²Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain; ³Department of Medicine, University of Seville, Seville, Spain

*Corresponding author. E-mail: ysmani-ibis@us.es

Received 12 December 2019; returned 6 January 2020; revised 7 February 2020; accepted 25 February 2020

Objectives: Repurposing drugs provides a new approach to the fight against MDR Gram-negative bacilli (MDR-GNB). Rafoxanide, a veterinary antihelminthic drug, has shown antibacterial activity *in vitro* against Gram-positive bacteria. We aimed to analyse the *in vitro* and *in vivo* efficacy of rafoxanide in combination with colistin against colistin-susceptible (Col-S) and colistin-resistant (Col-R) GNB.

Methods: A collection of Col-S and Col-R *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* were used. Checkerboard and time-kill curve analyses were performed to determine the synergy between rafoxanide and colistin. Changes in membrane structure and permeability were analysed using transmission electron microscopy and fluorescence assays. A murine peritoneal sepsis model using Col-R strains of these pathogens was performed to study the efficacy of rafoxanide (10 mg/kg/24 h, IV), colistimethate sodium (CMS) (20 mg/kg/8 h, intraperitoneally) and rafoxanide (10 mg/kg/24 h, IV) plus CMS (20 mg/kg/8 h, intraperitoneally) for 72 h.

Results: Rafoxanide showed MICs ≥ 256 mg/L for all Col-S and Col-R strains. Checkerboard and time-kill curve analyses showed that rafoxanide (1 mg/L) is more synergistic with colistin against Col-R than Col-S strains. Col-R, but not Col-S, strains treated with rafoxanide demonstrated higher membrane permeabilization. Transmission electron microscopy visualization confirmed that Col-R strains suffer morphological changes. In the murine peritoneal sepsis model with Col-R strains, rafoxanide plus CMS, compared with CMS alone, increased mouse survival to 53.8% and 73.3%, and reduced bacterial loads in tissues and blood between 2.34 and 4.99 log₁₀ cfu/g or mL, respectively.

Conclusions: Rafoxanide repurposing, as monotherapy and in combination with CMS, may address the urgent need for new treatments for infections caused by MDR-GNB.

Introduction

Infections caused by MDR Gram-negative bacilli (GNB) such as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* represent an increasing worldwide problem.¹ Development of resistance to most available antibiotics such as β -lactams, aminoglycosides or fluoroquinolones by GNB has revived the use of old classes of antibiotic such as colistin.² However, the increased use of colistin against GNB infections in the last decade has increased the rate of colistin resistance worldwide, which has reached high levels in some countries.^{3,4} Of note, the appearance of the plasmid-mediated colistin resistance *mcr* gene and its rapid dissemination has posed a public health risk for the EU/European Economic Area.⁵ Therefore, there is an urgent need to find new therapies in order to achieve better success in the treatment of

bacterial infections. In this context, the concept of 'repurposing' (the search for new uses for existing drugs) has gained renewed interest. Several groups are using this strategy to find new drugs that can be used as monotherapy or in combination therapy with clinically relevant antibiotics such as colistin.^{6,7} Rafoxanide is an antihelminthic drug belonging to the salicylanilide family, used against fluke infections in ruminants. It has been reported that rafoxanide demonstrates anticancer and antibacterial activity against *Clostridioides difficile* and *Helicobacter pylori*, probably via membrane depolarization.⁸⁻¹⁰ Niclosamide, another salicylanilide with a similar chemical structure to rafoxanide, has also demonstrated antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *H. pylori*, *C. difficile* and *P. aeruginosa*.⁹⁻¹⁴ Recently, Domalaon *et al.*¹⁵ and our group¹⁶ have demonstrated that niclosamide restores the colistin activity in colistin-resistant (Col-R) *A. baumannii*,

Miró-Canturri et al.

P. aeruginosa, *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae*. The synergy between rafoxanide and colistin has recently been reported *in vitro* but there are no data regarding the activity of the combination of these drugs against GNB *in vivo*.¹⁷ The aim of this study was to determine the *in vitro* and *in vivo* activity of rafoxanide, in monotherapy and in combination with colistin, against colistin-susceptible (Col-S) and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains, as well as to identify the mechanism of action of rafoxanide.

Material and methods

All materials and methods are detailed in the Supplementary Materials and methods (available as Supplementary data at JAC Online).

Statistical analysis

Group data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). For *in vitro* studies, Student's *t*-test and the Mann-Whitney test were used to determine differences between means. Differences in bacterial spleen, lung and blood concentrations (mean \pm SEM \log_{10} cfu/g or \log_{10} cfu/mL) were assessed by analysis of variance (ANOVA) and post hoc Dunnett's and Tukey's tests. Differences in percentage mortality between groups were compared using the χ^2 test. *P* values of <0.05 were considered significant. The SPSS (version 21.0; SPSS Inc.) statistical package was used.

Results

In vitro activity of rafoxanide alone and in combination with colistin against Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*

Rafoxanide alone or in combination with colistin was tested against reference and clinical strains of Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. The MICs are presented in Table 1. Rafoxanide alone showed MIC values of ≥ 256 mg/L for Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains. Checkerboard assay showed that rafoxanide at 0.25–1 mg/L demonstrated synergy with colistin against *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. Therefore, 1 mg/L of rafoxanide was chosen as an optimal concentration for the rest of the experiments. Rafoxanide at 1 mg/L in combination with colistin increased the activity of colistin against most of the strains, with an FIC index (FICI) of ≤ 0.01 –0.12 and fold change ranging from 4 to ≥ 1024 (Table 1). Interestingly, *A. baumannii* and *P. aeruginosa* Col-R strains demonstrated lower FICI values and higher fold change values than Col-S strains, indicating higher synergistic effect of these drugs on Col-R strains.

As well as niclosamide,¹⁵ the combination of rafoxanide with other antibiotics (such as imipenem, ciprofloxacin, piperacillin/tazobactam and vancomycin) was studied against some strains of *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *E. coli* and no synergy was found (Table S1).

Time-kill curves

Using time-course assays, we examined the bactericidal activity of rafoxanide in combination with colistin against Col-S and Col-R strains of *A. baumannii* (ATCC 17978 and CR17), *P. aeruginosa*

(PAO1 and M5) and *K. pneumoniae* (CECT 997 and Kp21). Figure 1a shows that 1 mg/L rafoxanide in combination with 0.125 mg/L colistin (0.5 \times MIC of colistin for the ATCC 17978 strain) demonstrated a synergistic and bactericidal effect at 8 h, decreasing the bacterial count by 3.90 \log_{10} cfu/mL compared with colistin alone. In the case of PAO1 and CECT 997, 1 mg/L rafoxanide in combination with 0.5 and 0.25 mg/L colistin (0.5 \times MIC of colistin for PAO1 and CECT 997 strains, respectively) did not show synergistic activity with respect to colistin alone at 8 h (Figure 1a). Regarding the Col-R strains CR17, M5 and Kp21, 1 mg/L rafoxanide in combination with 32, 256 and 16 mg/L colistin (0.5 \times MIC of colistin for CR17, M5 and Kp21 strains, respectively) showed higher synergistic activity at 4–8 h of incubation. The bacterial cell count of these strains in the presence of rafoxanide in combination with colistin decreased by 8.95, 5.44 and 2.16 \log_{10} cfu/mL, respectively, compared with colistin alone at 24 h of incubation (Figure 1b). In control experiments, 1 mg/L rafoxanide had no effect on the growth of Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* (Figure 1a and b). Moreover, higher rafoxanide concentrations (128 and 256 mg/L) did not demonstrate a bactericidal or bacteriostatic effect at 24 h of growth of Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. However, a marked delay in the bacterial growth was observed for *A. baumannii* CR17 (Figure S1).

Effect of rafoxanide on outer membrane protein (OMP) profile

The OMP profiles of *A. baumannii* (ATCC 17978 and CR17), *P. aeruginosa* (PAO1 and M5) and *K. pneumoniae* (CECT 997 and Kp21) strains in the absence or presence of 1 mg/L rafoxanide incubated at 4 or 24 h did not show significant changes between control and treatment conditions (Figure S2). These results suggest that rafoxanide did not alter the expression of OMPs.

Effect of rafoxanide on bacterial membrane permeability

In order to determine the mechanism of action whereby rafoxanide increased the susceptibility to colistin, membrane permeabilization assays were performed for the three pathogens. Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains were treated with 1 mg/L rafoxanide and incubated with ethidium homodimer-1 (EthD-1), a DNA stain that is not able to cross intact membranes. Fluorescence microscopy analysis showed an increase in cellular fluorescence of Col-S and Col-R *A. baumannii* and *P. aeruginosa* strains in the presence of rafoxanide when compared with untreated cells, being higher in the case of Col-R strains. This effect was milder for both Col-S and Col-R *K. pneumoniae* strains (Figure 2a). Moreover, 2 h of fluorescence monitoring using a Typhoon FLA scanner confirmed the results obtained by fluorescence microscopy, in which rafoxanide increased the permeability of Col-S and Col-R *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, with Col-R strains being more permeable. In contrast, a slight increase was observed in Col-S and Col-R *K. pneumoniae* strains (Figure 2b). In the control, basal levels of fluorescence were observed. These data suggest that rafoxanide increased membrane bacterial permeability, mostly in Col-R strains.

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article-abstract/doi/10.1093/jac/kaa103/5815244 by Y. smari@hcmrmail.com on 02 April 2020

CAPÍTULO II. Artículo 3

JAC

Rafoxanide potentiates the effect of colistin against GNB

Table 1. MIC determination of rafoxanide and colistin alone or in combination against Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*

Pathogen	Strain	MIC mg/L			RAF synergy with COL	FICI	Fold change in COL MIC	
		COL	RAF	COL in the presence of 1 mg/L RAF				
<i>A. baumannii</i>	Col-S							
		ATCC 17978	0.25	≥256	0.06	≥0.25	0.12	4
		Ab9	0.125	≥256	0.015	≥0.25	0.12	8
		Ab186	0.25	≥256	0.015	≥0.25	0.06	16
		Ab5	0.125	≥256	0.06	—	0.51	2
		Ab10	1	≥256	0.125	≥0.5	0.12	8
		Ab12	0.25	≥256	0.015	≥0.5	0.06	16
		Ab13	0.125	≥256	0.007	≥1	0.03	32
		Ab325	0.125	≥256	0.007	≥1	0.06	16
		Ab326	0.25	≥256	0.03	≥1	0.12	8
		Ab327	0.125	≥256	0.007	≥0.25	0.06	16
		Ab328	0.125	≥256	0.03	≥0.25	0.24	4
		Col-R						
		#1	≥512	≥256	0.5	≥0.25	<0.01	≥1024
	#10	≥512	≥256	0.5	≥0.25	<0.01	≥1024	
	#11	256	≥256	≤0.5	≥0.5	<0.01	≥512	
	#14	512	≥256	≤0.5	≥0.5	<0.01	≥1024	
	#16	≥512	≥256	1	≥0.25	<0.01	≥512	
	#17	512	≥256	≤0.5	≥0.5	<0.01	≥1024	
	#19	≥512	≥256	0.5	≥0.25	<0.01	≥1024	
	#20	64	≥256	≤0.5	≥0.25	<0.01	≥128	
	#22	128	≥256	≤0.5	≥0.25	<0.01	≥256	
	#24	128	≥256	≤0.5	≥0.25	<0.01	≥256	
	#99	64	≥256	≤0.5	≥0.25	<0.01	≥128	
	#113	256	≥256	0.5	≥1	<0.01	512	
	CR17	64	≥256	≤0.5	≥0.5	<0.01	≥128	
<i>P. aeruginosa</i>	Col-S							
		PAO1	1	≥256	0.25	≥1	0.25	4
		Pa39	1	≥256	0.25	≥1	0.25	4
		Pa238	2	≥256	1	—	0.51	2
		Pa20	0.125	≥256	0.06	—	0.51	2
		Pa43	1	≥256	0.5	—	0.51	2
		Pa62	0.5	≥256	0.25	—	0.51	2
		Pa76	0.25	≥256	0.125	—	0.51	2
		Pa90	2	≥256	1	—	0.51	2
		Pa110	1	≥256	0.06	≥1	0.06	16
		Pa130	0.25	≥256	0.03	≥1	0.12	8
		Pa158	1	≥256	0.125	≥1	0.125	8
		Col-R						
		M1	512	≥256	≤0.5	≥0.25	<0.01	≥1024
	M4	32	≥256	4	≥1	0.125	8	
	M5	512	≥256	4	≥0.5	<0.01	128	
	Pa82	32	≥256	0.5	≥0.5	0.017	64	
	Pa440	256	≥256	0.5	≥0.5	<0.01	512	
	Pa564	8	≥256	0.25	≥1	0.03	32	

Continued

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article-abstract/doi/10.1093/jac/ckaa103/5815244 by Y. smari@jrcmail.com on 02 April 2020

CAPÍTULO II. Artículo 3

Miró-Canturri et al.

Table 1. Continued

Pathogen	Strain	MIC mg/L			RAF synergy with COL	FICI	Fold change in COL MIC	
		COL	RAF	COL in the presence of 1 mg/L RAF				
<i>K. pneumoniae</i> Col-S	CECT 997	0.5	≥256	0.06	≥0.5	0.12	8	
	C1-4	0.5	≥256	0.06	≥0.25	0.12	8	
	C1-10	0.5	≥256	0.125	≥0.5	0.25	4	
	C1-14	2	≥256	0.125	≥0.5	0.06	16	
	C1-25	2	≥256	0.25	≥0.25	0.12	8	
	C1-27	2	≥256	0.125	≥0.5	0.125	8	
	C1-30	1	≥256	0.5	—	0.51	2	
	C1-35	1	≥256	1	—	1	1	
	C1-39	2	≥256	0.25	≥1	0.125	8	
	C1-40	2	≥256	0.25	≥1	0.125	8	
	C1-42	0.5	≥256	0.03	≥0.5	0.06	16	
	Kp07	2	≥256	0.125	≥1	0.06	16	
	Col-R	Kp21	32	≥256	4	≥1	0.125	8
		Kp28	4	≥256	0.25	≥1	0.06	16
Kp29		16	≥256	4	≥1	0.25	4	
C1-259		32	≥256	0.5	≥0.5	0.02	64	
C1-264		32	≥256	4	≥0.5	0.125	8	
C1-266		32	≥256	0.25	≥0.5	<0.01	128	

COL, colistin; RAF, rafoxanide; Col-S, MIC of colistin ≤2 mg/L; Col-R, MIC of colistin >2 mg/L.

Effect of rafoxanide on the bacterial cell envelope

Considering the effect of rafoxanide on membrane permeability, transmission electron microscopy was used in order to observe whether rafoxanide induced morphological changes in the membrane of Col-R *A. baumannii* CR17, *P. aeruginosa* M5 and *K. pneumoniae* Kp21 strains. Untreated cells revealed a normal cell shape, slightly corrugated, with an undamaged inner and outer membrane. After incubation with 1 mg/L rafoxanide, the M5 strain showed a highly corrugated membrane and CR17 and Kp21 showed blurred boundaries in some areas of the membrane (Figure 3a). These alterations indicated a loss of membrane integrity as well as membrane disruption. Therefore, rafoxanide disrupts the integrity of the cell envelope but these changes are not enough to cause bacterial killing, as observed in the time-kill curves.

Effect of rafoxanide on the bacterial surface charge

Although rafoxanide's mechanism of action is not well understood, it is thought to involve the dissipation of membrane potential. In order to know whether rafoxanide affects the surface charge of the bacterial membrane, zeta potential assays were performed. Zeta potential is an electrochemical property of cell surfaces that is determined by the net electrical charge of molecules exposed at the surface of cell membranes.¹⁸ In most bacteria, the net surface charge is negative and its interaction with some agents may be governed by electrostatic interactions that

conduce to alter this parameter. Analysis of zeta potential revealed that treatment with 1 mg/L rafoxanide significantly reduced the surface charge of the *A. baumannii* ATCC 17978 and CR17 strains from -29.38 ± 1.17 to -32.14 ± 0.26 mV ($P < 0.05$) and from -31.40 ± 0.84 to -36.57 ± 0.69 mV ($P < 0.05$), respectively. Similar results were found in *K. pneumoniae*, where treatment with rafoxanide reduced the surface charge from -37.57 ± 3.50 mV to -49.62 ± 2.75 mV ($P < 0.05$) in CECT 997 and from -29.2 ± 0.86 to -31.46 ± 0.29 mV ($P < 0.05$) in Kp21 (Figure 3b). On the contrary, no differences were found in *P. aeruginosa* strains.

Effect of rafoxanide on reactive oxygen species (ROS) production

It is well known that some antibiotics, mostly bactericidal ones, increase the production of ROS conducive to bacterial killing.¹⁹ Here, we studied whether rafoxanide induced ROS production using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). DCFH-DA is a cell-permeable non-fluorescent probe that, after intracellular de-esterification, generates highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein upon oxidation. This process enables the rapid quantification of ROS in response to oxidative metabolism. The incubation of Col-R strains with DCFH-DA and 1 mg/L rafoxanide alone or in combination with 0.5× MIC of colistin (32, 256 and 16 mg/L, for CR17, M5 and Kp21 strains, respectively) for 6, 20 and 24 h did not increase the levels of ROS when compared with untreated strains (Figure S3).

4 of 11

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article-abstract/doi/10.1093/jac/ckaa103/5815244 by Y. Smanthi@jhrmail.com on 02 April 2020

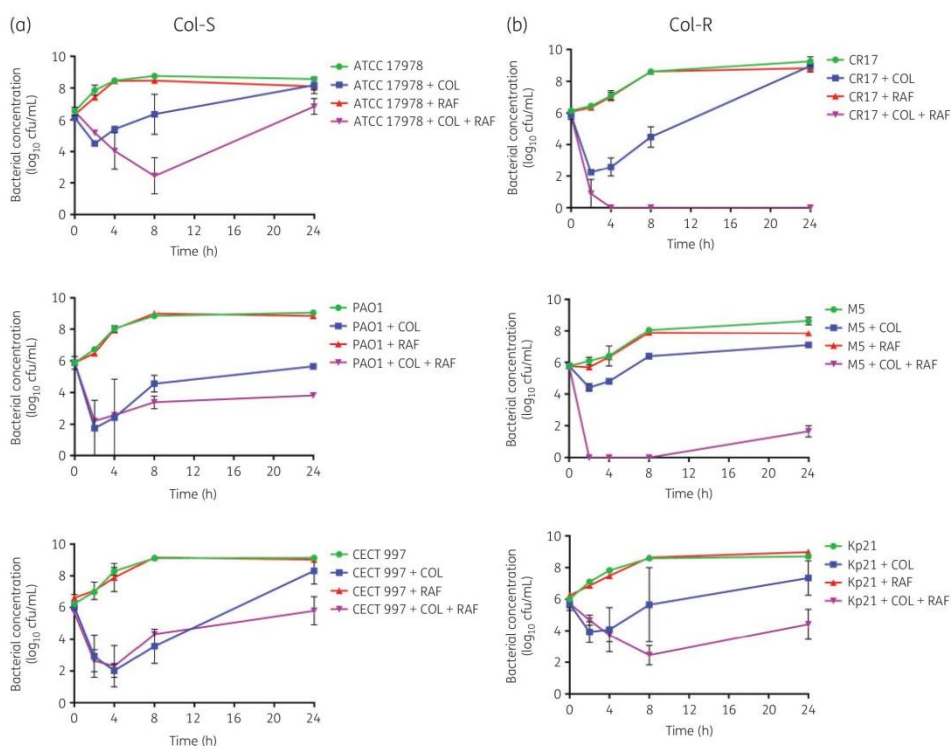


Figure 1. Rafoxanide potentiates colistin activity against Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. Time-kill curves of Col-S *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1 and *K. pneumoniae* CECT 997 strains (a) and Col-R *A. baumannii* CR17, *P. aeruginosa* M5 and *K. pneumoniae* Kp21 strains (b) in the presence of 1 mg/L rafoxanide and 0.5× MIC colistin, alone or in combination with rafoxanide for 24 h. COL, colistin; RAF, rafoxanide. Data are represented as mean ± SEM from two independent experiments. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

***In vivo* activity of rafoxanide alone and in combination with colistin against GNB infections in immunocompetent mice**

To confirm the *in vitro* synergistic effect of rafoxanide with colistin against *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* and to study this synergy in a complete organism, we moved to a vertebrate model of infection by these pathogens. Our initial studies in mice did not reveal any evidence of toxicity at a dose of ≤20 mg/kg rafoxanide; mice treated with 10 and 20 mg/kg showed 100% survival (Figure S4). In a murine model of peritoneal sepsis, rafoxanide (10 mg/kg/24 h, IV) in combination with colistimethate sodium (CMS) (20 mg/kg/8 h, intraperitoneally) was administered to mice 4 h after intraperitoneal challenge with the dose of CR17, M5 and Kp21 strains that caused 100% mortality, which was 7.2, 8.5 and 7.5 log cfu/mL, respectively. We showed that the combination treatment reduced the bacterial load in the spleen by 4.96,

3.21 and 3.21 log₁₀ cfu/g ($P < 0.05$), in lung by 5.5, 3.9 and 3.84 log₁₀ cfu/g ($P < 0.05$) and in blood by 5.13, 4.94 and 4.76 log₁₀ cfu/mL ($P < 0.05$), respectively, when compared with control groups (Table 2). In contrast, CMS alone did not decrease the bacterial spleen, lung and blood loads of the Col-R CR17, M5 and Kp21 strains, relative to control groups (Table 2). Mice receiving combined treatment with rafoxanide plus CMS showed a greater increase in survival compared with those receiving colistin alone or the controls (Table 2 and Figure 4).

Unexpectedly, administration of rafoxanide as monotherapy also significantly reduced the bacterial loads in spleen, lung and blood and increased the survival, compared with controls, by levels similar to combined treatments (Table 2). Thus, rafoxanide as monotherapy and in combination with CMS demonstrates *in vivo* activity against Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains.

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article-abstract/doi/10.1093/jac/ckaa103/5815244 by Y. smari@htrmail.com on 02 April 2020

CAPÍTULO II. Artículo 3

Miró-Canturri et al.

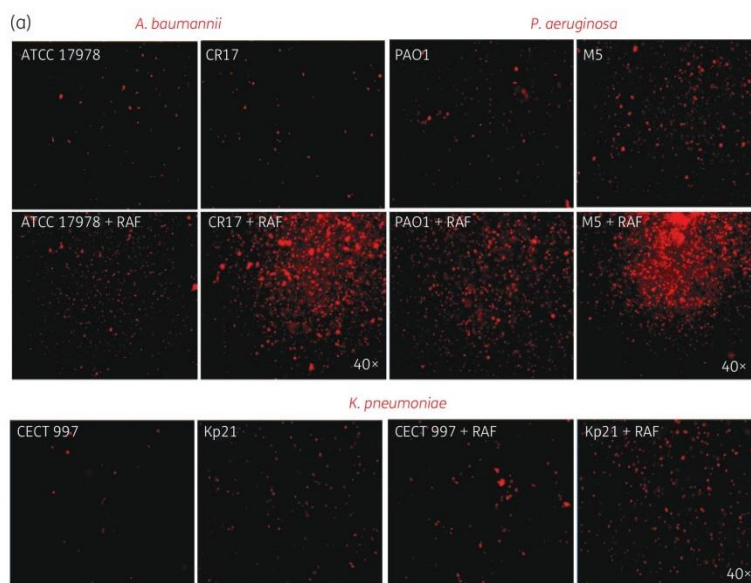


Figure 2. Effect of rafoxanide on bacterial cell permeability. (a) Membrane permeabilization of EthD-1 probe in the absence or presence of 1 mg/L rafoxanide in *A. baumannii* ATCC 17978 (Col-S) and CR17 (Col-R), *P. aeruginosa* PAO1 (Col-S) and M5 (Col-R) and *K. pneumoniae* CECT 997 (Col-S) and Kp21 (Col-R) strains, using fluorescence microscopy. (b) Membrane permeabilization of EthD-1 probe quantified by Typhoon FLA scanner. CTL, control (1× PBS); RAF, rafoxanide. Data are represented as mean ± SEM from three replicates in two independent experiments. * $P < 0.05$ compared with CR17 or M5. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

***In vivo* activity of rafoxanide as monotherapy against GNB infections in immunosuppressed mice**

Previous studies have demonstrated that infection with *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* in immunosuppressed mice is lethal.^{20–22} To determine whether rafoxanide treatment is still therapeutically effective in infected immunosuppressed mice, we treated immunocompetent mice with cyclophosphamide to reduce the number of circulating monocytes, neutrophils and dendritic cells (Figure S5). After infection of neutropenic mice with CR17, M5 and Kp21 strains, rafoxanide treatment increased mouse survival non-significantly in all infection groups to 33.33%, 14.3% and 33.33%, respectively, somewhat less than the 50% observed in the immunocompetent mice. Moreover, rafoxanide treatment non-significantly reduced the bacterial loads of CR17, M5 and Kp21 in spleen, lung and blood in neutropenic mice after treatment with rafoxanide (Table 3). Mice with low levels of innate immune cells were not able to resolve the infection although they had been treated with rafoxanide. These findings suggest that immune system response is necessary for rafoxanide to protect mice from infections by Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*.

Discussion

The emergence of MDR GNB has prompted the use of colistin as the last resort in the treatment of severe infections by these pathogens. Although uncommon, colistin resistance is increasing and its spread is being considered as a global health threat.⁴ Due to the disruptive action of rafoxanide on the *H. pylori* membrane described by Tharmalingam *et al.*¹⁰ and its ability to act as a proton carrier, we hypothesized that rafoxanide may restore colistin activity in Col-R strains of GNB. In this study we showed that rafoxanide increased the activity of colistin against Col-S and Col-R strains of *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, especially in Col-R strains. It is noteworthy that rafoxanide alone did not inhibit *in vitro* bacterial growth of these strains, in accordance with previously published data regarding the antibacterial activity of the salicylanilide drug family, but some inhibitory effect on the *A. baumannii* Col-R strain was indeed observed.^{10,16,17} Although the alterations in the bacterial membrane produced by rafoxanide were not sufficient to compromise bacterial viability, these changes may potentiate the effect of colistin. It was observed that rafoxanide produces an increase in membrane permeability in Col-R strains of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. Less membrane permeabilization was observed in Col-S strains of *A. baumannii*,

Downloaded from <https://academic.oup.com/jac/advance-article-abstract/doi/10.1093/jac/ckaa103/5815244> by Y. smari@htrmail.com on 02 April 2020

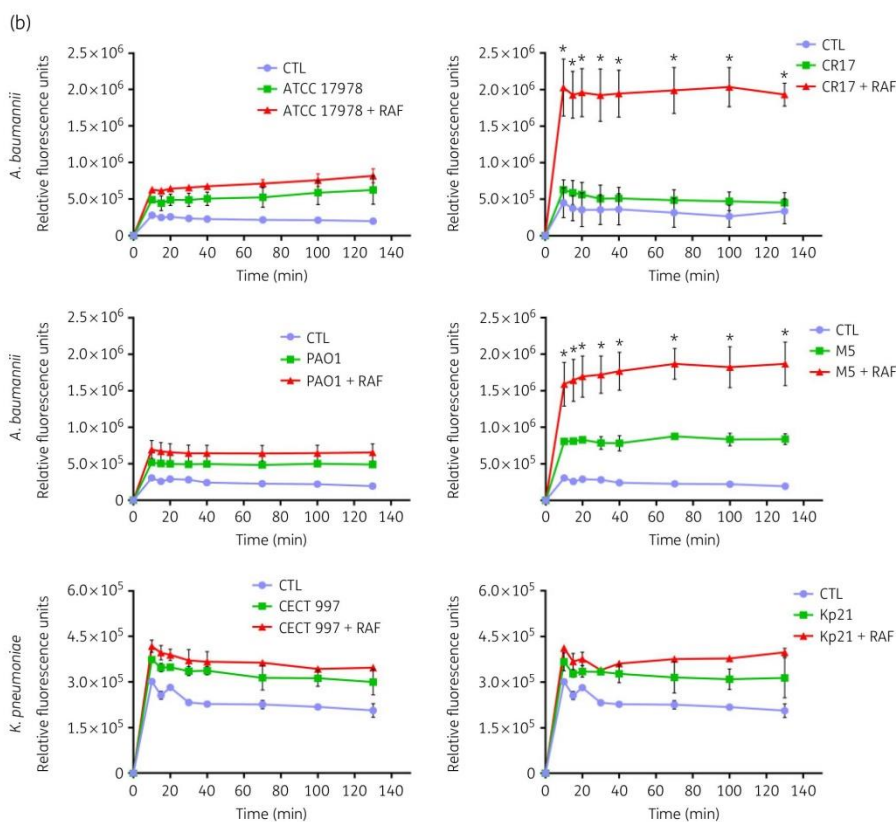


Figure 2. Continued

P. aeruginosa strains and *K. pneumoniae*, which may explain the lower fold change observed with checkerboard assays. Bacterial visualization using transmission electron microscopy confirmed the disruptive action of rafoxanide on the bacterial cell envelope. Colistin, a positively charged antibiotic, acts on the outer membrane of GNB, interacting electrostatically and displacing divalent cations such as calcium or magnesium.² It has been reported that Col-R strains of *A. baumannii*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* express less negative charge on the cell surface, thereby reducing the interaction with colistin.²³⁻²⁵ In our study, we showed that rafoxanide increased the negativity of the Col-R *A. baumannii* and Col-R *K. pneumoniae* surface charge, probably improving the interaction of colistin with the LPS and thereby contributing to the increase in colistin susceptibility. These data are consistent with previous work reporting that niclosamide, another salicylanilide drug with a similar chemical structure to rafoxanide, increased the

negativity of the Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* surface charge.¹⁶ In the case of *P. aeruginosa*, rafoxanide had no effect on the negative charge of the Col-R strain. We suggest that for *P. aeruginosa* the synergy found between rafoxanide and colistin is not based on the more negative charge induced in the cell wall by rafoxanide. Moreover, OMP profiles were not modified after incubation with rafoxanide, indicating that changes in OMP expression could not be related to the mechanism of action of rafoxanide. Similar results were observed for oxytetracycline, another member of the tetracyclines, but not with niclosamide.^{13,16,26} Modification of ROS production after rafoxanide incubation was also discarded as a possible mechanism of action of rafoxanide. It is noteworthy to mention that rafoxanide alone and in combination with CMS was effective in the murine peritoneal sepsis model of Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, reducing the bacterial loads by around $3-5 \log_{10}$ cfu/g in

CAPÍTULO II. Artículo 3

Miró-Canturri et al.

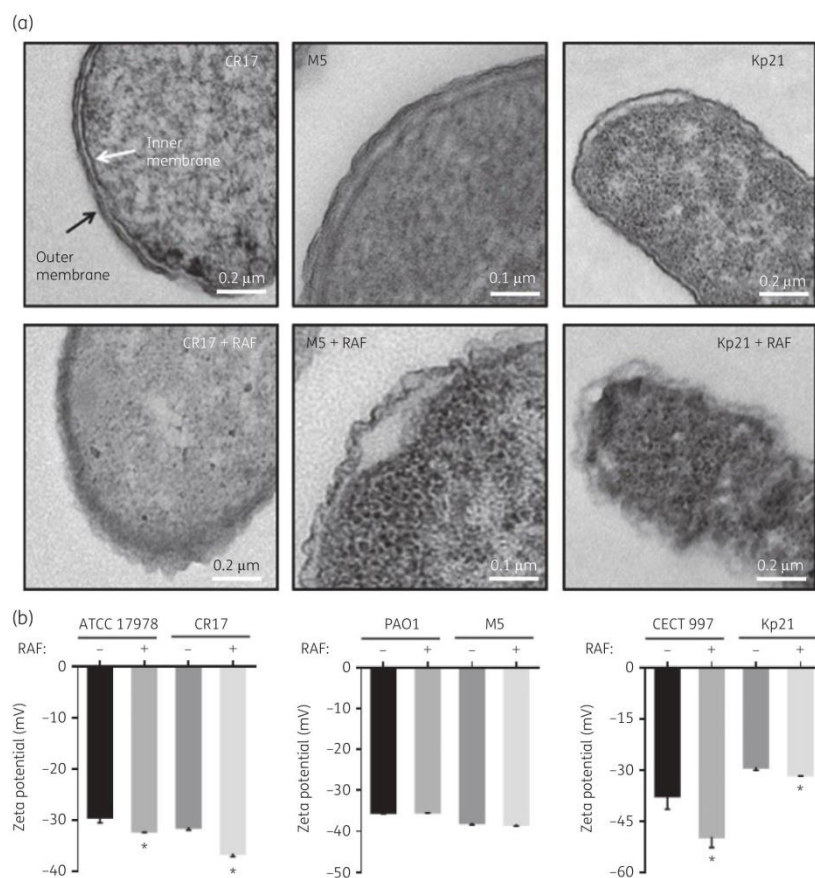


Figure 3. Rafoxanide effect on the integrity of the bacterial cell envelope and the surface charge. (a) Transmission electron microscopy visualization of *A. baumannii* CR17, *P. aeruginosa* M5 and *K. pneumoniae* Kp21 in the absence or presence of 1 mg/L rafoxanide incubated for 24 h. (b) Zeta potential of Col-S *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1 and *K. pneumoniae* CECT 997 strains and Col-R *A. baumannii* CR17, *P. aeruginosa* M5 and *K. pneumoniae* Kp21 strains in the presence or absence of rafoxanide. Data are the mean \pm SEM obtained from three replicates in three independent experiments. * $P < 0.05$ untreated cells compared with rafoxanide treatment. RAF, rafoxanide.

tissues and 3–5 \log_{10} cfu/mL in blood. Unexpectedly, rafoxanide alone showed antibacterial activity against these pathogens *in vivo*. Partially, this activity may be due to the action of the drug on the innate immune system, as we have shown in the experiments using the immunosuppressed mouse model. The immune cells and the pathways involved in rafoxanide activity are unknown. Another study showed that niclosamide reduced the production of cytokines and chemokines by bone marrow-derived dendritic cells, after stimulation with LPS, and attenuated the

activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and NF- κ B pathways, which are closely related to the inflammatory response.²⁷ Studies on AML cells showed an antineoplastic effect of niclosamide through inhibition of the NF- κ B pathway in AML cells.²⁸ Moreover, the stimulation of autophagy by salicylanilide derivatives due to the inhibition of mammalian target of rapamycin complex (mTORC) signalling prevented *Mycobacterium tuberculosis* proliferation in infected macrophages.²⁹ However, as well as other salicylanilide drugs, rafoxanide action might be not

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article-abstract/doi/10.1093/jac/ckaa103/5815244 by Y. sman@jrcmail.com on 02 April 2020

Rafoxanide potentiates the effect of colistin against GNB

Table 2. Therapeutic effect of rafoxanide alone and in combination with colistin in the murine peritoneal sepsis model using Col-R *A. baumannii* CR17, *P. aeruginosa* M5 and *K. pneumoniae* Kp21

Strain	Treatment	n	Bacterial load (mean ± SEM)			Survival (%)
			spleen (log ₁₀ cfu/g)	lung (log ₁₀ cfu/g)	blood (log ₁₀ cfu/mL)	
CR17	control	15	9.61±0.13	9.90±0.08	9.42±0.08	0
	RAF	14	4.60±1.17*	5.58±1.17*	4.69±1.20*	50*
	CMS	12	8.00±0.86	8.43±0.93	7.89±0.96	16.7
	CMS + RAF	13	4.24±1.20*	4.37±1.16*†	4.20±1.21*	53.8*
M5	control	10	8.93±0.52	8.87±0.51	8.81±0.59	0
	RAF	14	5.66±0.88*	4.96±0.87*	4.51±0.98*	50*
	CMS	14	8.87±0.41	8.61±0.28	8.86±0.27	6.7
	CMS + RAF	15	5.72±0.50*†	4.97±0.58*†	3.87±0.51*†	73.3*
Kp21	control	8	8.54±0.62	8.79±0.58	8. ± 0.54	25
	RAF	14	5.45±0.99*	5.67±1.40*	5.83±1.06*	50
	CMS	14	7.67±0.61	7.78±0.68	7.39±0.85	35.7
	CMS + RAF	15	5.33±0.73*†	4.95±0.65*†	3.96±0.76*†	67*

Bacterial loads were determined in spleen, lung and blood. Differences in bacterial spleen, lung and blood concentrations were assessed by ANOVA and *post hoc* Dunnett's and Tukey's tests.

RAF, rafoxanide.

**P* < 0.05 compared with the control group and †*P* < 0.05 compared with the colistin group.

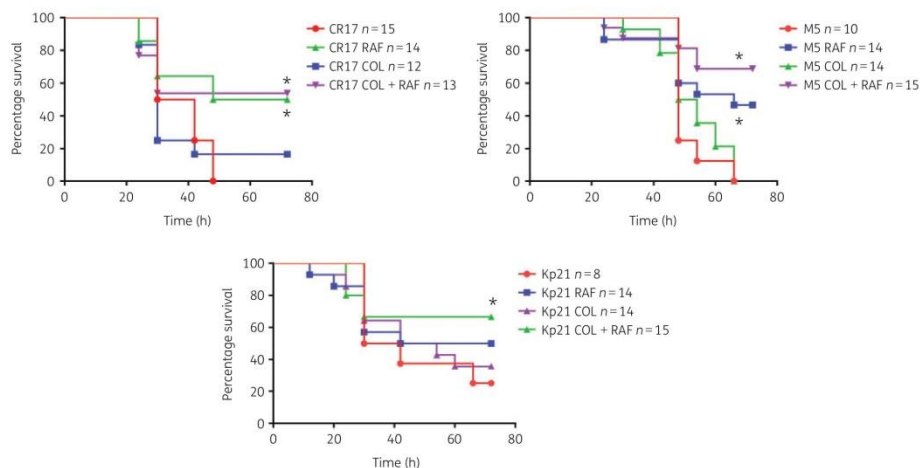


Figure 4. Therapeutic effect of rafoxanide (10 mg/kg/24 h) alone and in combination with CMS (20 mg/kg/8 h) in the murine peritoneal sepsis model with Col-R *A. baumannii* CR17, *P. aeruginosa* M5 and *K. pneumoniae* Kp21 strains. Survival rates of 8 to 15 mice were analysed using Kaplan-Meier curves. Differences in mortality were compared by the χ^2 test. **P* < 0.05 compared with the control group. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

limited to only the host immune response but also involved in mechanisms related to bacteria, such as virulence factors and quorum sensing.^{13,30} A recent study showed that, although niclosamide ethanolamine is not able to affect the growth of *C. difficile*

in vitro, it reduces its *in vivo* virulence in mice by the inhibition of *C. difficile* toxins, without affecting *in vitro* growth.¹² Similar results were observed in *P. aeruginosa*, where the inhibition of quorum sensing by niclosamide protected almost 100% of *Galleria*

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article-abstract/doi/10.1093/jac/ckaa103/5815244 by Y. sman@jhrmail.com on 02 April 2020

CAPÍTULO II. Artículo 3

Miró-Canturri et al.

Table 3. Therapeutic effect of rafoxanide in the immunosuppressed murine peritoneal sepsis model using Col-R *A. baumannii* CR17, *P. aeruginosa* M5 and *K. pneumoniae* Kp21

Strain	Treatment	n	Bacterial load (mean ± SEM)			Survival (%)
			spleen (log ₁₀ cfu/g)	lung (log ₁₀ cfu/g)	blood (log ₁₀ cfu/mL)	
CR17	CPM	7	9.93±0.35	9.70±0.13	8.90±0.37	0
	CPM + RAF	15	7.13±1.06	6.50±0.90*	6.22±0.92	33.33
M5	CPM	12	9.78±0.46	8.88±0.15	8.70±0.19	0
	CPM + RAF	14	9.08±0.46	7.87±0.14	7.14±0.71	14.3
Kp21	CPM	10	8.96±0.70	8.33±0.77	7.55±1.01	20
	CPM + RAF	15	8.64±0.62	7.80±0.59	6.89±0.77	33.33

Bacterial loads were determined in spleen, lung and blood. Differences in bacterial spleen, lung and blood concentrations were assessed by the Mann-Whitney test. Differences in survival (%) between groups were compared using χ^2 test.

CPM, mice immunosuppressed with cyclophosphamide; RAF, rafoxanide.

*P < 0.05 compared with CPM group.

mellonella larvae from a lethal challenge, despite niclosamide not demonstrating bactericidal activity against *P. aeruginosa* *in vitro*.^{11,13} Thus, it is plausible that rafoxanide may act directly against *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* without compromising bacterial growth and fitness *in vitro*. Moreover, increases in animal survival and reduction of tissue and blood bacterial loads have been observed with rafoxanide monotherapy against *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* infections. As expected, CMS monotherapy had no significant therapeutic efficacy against Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains. In addition, rafoxanide did not improve the therapeutic efficacy of CMS against these pathogens in terms of bacterial clearance from either tissue or blood, in contrast to the reduction in the MIC of colistin in the *in vitro* experiments.

One possible explanation could be that rafoxanide has reached the maximum therapeutic effect without further reducing the bacterial load in tissues and fluid and cannot potentiate the effect of CMS observed in monotherapy. Therefore, the present results would suggest that the administration of rafoxanide at 10 mg/kg/24 h for 72 h is appropriate for the treatment of GNB infections, even for Col-R isolates.

Conclusions

The results of this study provide new insights into the use of rafoxanide against MDR-GNB where the therapeutic options are reduced. Nevertheless, further studies are needed in order to elucidate the action of rafoxanide *in vivo* and its implications for the host, as well as finding an optimal dosage to achieve, in terms of efficacy and safety, clinical efficacy in the treatment of infections by MDR GNB.

Acknowledgements

This study has previously been presented in part at the Twenty-Ninth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, The Netherlands, 2019. Abstract O0526.

Funding

This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Proyectos de Investigación en Salud (grants PI16/01378 and PI16/01306), and by Plan Nacional de I + D+i 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0009)—co-financed by European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe', Operative program Intelligent Growth 2014-2020. Younes Smani is supported by the Subprograma Miguel Servet Tipo I from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (CP15/01358).

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Supplementary Materials and methods, Figures S1 to S5 and Tables S1 and S2 are available as Supplementary data at JAC Online.

References

- 1 WHO. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. <https://www.who.int/mediacentre/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.
- 2 Bialvaei AZ, Samadi KH. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin* 2015; **31**: 704–21.
- 3 Olaitan AO, Diene SM, Kempf M et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: an epidemiological and molecular study. *Int J Antimicrob Agents* 2014; **44**: 500–7.
- 4 Giamarellou H. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 2016; **48**: 614–21.
- 5 Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill* 2016; **21**: pii=30155.

- 6 Farha MA, Brown ED. Drug repurposing for antimicrobial discovery. *Nat Microbiol* 2019; **4**: 565–77.
- 7 Miró-Canturri A, Ayerbe-Algaba R, Smani Y. Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. *Front Microbiol* 2019; **28**: 10–41.
- 8 Shi X, Li H, Shi A et al. Discovery of rafoxanide as a dual CDK4/6 inhibitor for the treatment of skin cancer. *Oncol Rep* 2018; **40**: 1592–600.
- 9 Gooyit M, Janda KD. Reprofiled anthelmintics abate hypervirulent stationary-phase *Clostridium difficile*. *Sci Rep* 2016; **16**: 33642.
- 10 Tharmalingam N, Port J, Castillo D et al. Repurposing the anthelmintic drug niclosamide to combat *Helicobacter pylori*. *Sci Rep* 2018; **8**: 3701.
- 11 Rajamuthiah R, Fuchs BB, Conery AL et al. Repurposing salicylanilide anthelmintic drugs to combat drug resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2015; **10**: e0124595.
- 12 Tam J, Hamza T, Ma B et al. Host-targeted niclosamide inhibits *C. difficile* virulence and prevents disease in mice without disrupting the gut microbiota. *Nat Commun* 2018; **9**: 5233.
- 13 Imperi F, Massai F, Ramachandran-Pillai C et al. New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 996–1005.
- 14 Costabile G, d'Angelo I, Rampioni G et al. Toward repositioning niclosamide for antivirulence therapy of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections: development of inhalable formulations through nanosuspension technology. *Mol Pharmaceutics* 2015; **12**: 2604–17.
- 15 Domalaon R, De Silva PM, Kumar A et al. The anthelmintic drug niclosamide synergizes with colistin and reverses colistin resistance in Gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; **63**: e02574–18.
- 16 Ayerbe-Algaba R, Gil-Marqués ML, Jiménez-Mejías ME et al. Synergistic activity of niclosamide in combination with colistin against colistin-susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; **8**: 348.
- 17 Domalaon R, Okunnu O, Zhanel GG et al. Synergistic combinations of anthelmintic salicylanilides oxytetrozamide, rafoxanide, and closantel with colistin eradicate multidrug-resistant colistin-resistant Gram-negative bacilli. *J Antibiot (Tokyo)* 2019; **72**: 605–16.
- 18 Halder S, Yadav KK, Sarkar R et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *Springerplus* 2015; **4**: 672.
- 19 Van Acker H, Coenye T. The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria. *Trends Microbiol* 2017; **25**: 456–66.
- 20 Luo G, Spellberg B, Gebremariam T et al. Diabetic murine models for *Acinetobacter baumannii* infection. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1439–45.
- 21 Pletzer D, Mansour SC, Wuerth K et al. New mouse model for chronic infections by Gram-negative bacteria enabling the study of anti-infective efficacy and host-microbe interactions. *mBio* 2017; **8**: e00140–17.
- 22 Zuluaga AF, Salazar BE, Rodríguez CA et al. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect Dis* 2006; **6**: 55.
- 23 Soon RL, Nation RL, Cockram S et al. Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 126–33.
- 24 Velkov T, Deris ZZ, Huang JX et al. Surface changes and polymyxin interactions with a resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Innate Immun* 2014; **20**: 350–63.
- 25 Lima MR, Ferreira GF, Nunes Neto WR et al. Evaluation of the interaction between polymyxin B and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cells: reactive oxygen species induction and zeta potential. *BMC Microbiol* 2019; **19**: 115.
- 26 Ayerbe-Algaba R, Gil-Marqués ML, Miró-Canturri A et al. The anthelmintic oxytetrozamide restores the activity of colistin against colistin-resistant Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents* 2019; **54**: 507–12.
- 27 Wu CS, Li YR, Chen JJ et al. Anthelmintic niclosamide modulates dendritic cells activation and function. *Cell Immunol* 2014; **288**: 15–23.
- 28 Jin Y, Lu Z, Ding K et al. Antineoplastic mechanisms of niclosamide in acute myelogenous leukemia stem cells: inactivation of the NF- κ B pathway and generation of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2010; **70**: 2516–27.
- 29 Lam KK, Zheng X, Forestieri R et al. Nitazoxanide stimulates autophagy and inhibits mTORC1 signaling and intracellular proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2012; **8**: e1002691.
- 30 Kauppi AM, Nordfjell R, Högglund U et al. Salicylanilides are potent inhibitors of type III secretion in *Yersinia*. *Adv Exp Med Biol* 2003; **529**: 97–100.

CAPÍTULO II. Artículo 3

SUPPLEMENTARY MATERIAL

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

Reference Col-S *A. baumannii* ATCC 17978 strain,¹ *P. aeruginosa* PAO1² and *K. pneumoniae* CECT 997³ strains were used in this study. We also used thirteen Col-R *A. baumannii* clinical isolates from an hospital outbreak in 2000 and from a meningitis patient in 2009,^{4,5} three *P. aeruginosa* Col-R clinical isolates from patients with cystic fibrosis,⁶ and one Col-S and three Col-R clinical isolates of *K. pneumoniae* from Spanish surveillance study in 2009⁷ (Table S1). MIC susceptibility breakpoint was determined according to the standard recommendations of the EUCAST being susceptible < 2 mg/L and resistant >2 mg/L.⁸

Antimicrobial agents and reagents

For the *in vitro* assays, standard laboratory powders of colistin sulfate salt (Sigma, Spain) and rafoxanide (Sigma, Spain), imipenem (Sigma, Spain), ciprofloxacin (Sigma, Spain), piperacillin (Sigma, Spain), tazobactam (Sigma, Spain) and vancomycin (Fluka, Spain) were used. For the *in vivo* experiments, clinical formulation of colistimethate sodium (CMS) (Promixin, Spain) was used. Rafoxanide was prepared by resuspension in DMSO (3.3%) and diluted to obtain a dose of 10 mg/kg. Euthanization of the mice was performed using sodium thiopental (Zambon S.p.A., Italy).

In vitro susceptibility testing

MICs of colistin (Sigma, Spain), rafoxanide (Sigma, Spain), and colistin in presence of 1 mg/L of rafoxanide against Col-S and Col-R reference and clinical isolates of *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* were determined in two independent experiments by broth microdilution method according to the standard recommendations of EUCAST for *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*.⁸ One milligram per liter rafoxanide has been used in this experiment because checkerboard assays showed higher synergy with colistin. Initial inoculums of 5.5×10^5 CFU/mL for each strain cultured in cation-adjusted Moeller Hinton Broth (Ca-MHB) were used in microtiter plates with U bottom (Deltlab, Spain) in presence of colistin, rafoxanide or colistin plus rafoxanide, and incubated for 16-18h at 37°C. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as control strain.

CAPÍTULO II. Artículo 3

Checkerboard assay

The assay was performed on a 96-well plate as previously described.⁹ Colistin was 2-fold serially diluted along the x axis, whereas rafoxanide was 2-fold serially diluted along the y axis to create a matrix, where each well consists of a combination of both agents at different concentrations. Bacterial cultures grown overnight were then diluted in saline to 0.5 McFarland turbidity, followed by 1:50 further dilution Ca-MHB and inoculation on each well to achieve a final concentration of approximately 5.5×10^5 CFU/mL. The 96-well plates were then incubated at 37°C for 18 h and examined for visible turbidity. The fractional inhibitory concentration (FIC) of the colistin was calculated by dividing the MIC of colistin in the presence of rafoxanide by the MIC of colistin alone. Similarly, the FIC of rafoxanide was calculated by dividing the MIC of rafoxanide in the presence of colistin by the MIC of rafoxanide alone. The FIC index was the summation of both FIC values. FIC index values of ≤ 0.5 were interpreted as synergistic. The same experiment was performed with imipenem, ciprofloxacin, piperacillin/tazobactam and vancomycin.

Time-kill kinetic assays

Time kill curves of Col-S *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1 and *K. pneumoniae* CECT 997 strains, and Col-R *A. baumannii* CR17, *P. aeruginosa* M5, and *K. pneumoniae* Kp21 strains were performed in duplicate as previously described.¹⁰ Initial inoculums of 1×10^6 UFC/mL were conducted on Ca-MHB in presence of 1 mg/L rafoxanide and 0.5xMIC colistin alone or in combination. Drug free broth was evaluated in parallel as a control. Tubes of each condition were incubated at 37°C with shaking and viable counts were determined by serial dilution at 0, 2, 4, 8 and 24 h. Viable counts were determined by plating 100 μ L of control, test cultures, or the respective dilutions at the indicated times onto sheep blood agar plates (Beckton Dickinson, USA). Plates were incubated for 24 h at 37 °C, and after colony counts, the \log_{10} of viable cells (CFU/mL) was determined. Synergy was defined as the reduction of $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL with the combination respect to the more active drug.¹¹ Therefore, rafoxanide was considered synergistic when in combination with colistin reduced the bacterial concentration $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL respect to colistin alone. Time-kill curves of Col-R strains, CR17, M5 and Kp21 in presence of 128 mg/L and 256 mg/L of rafoxanide were also performed on Ca-MHB and following the same procedure described above.

CAPÍTULO II. Artículo 3

Analysis of outer membrane proteins (OMPs) profile

Bacterial cells were grown in LB Broth to the logarithmic phase, incubated with 1 mg/L rafoxanide for 4 or 24 h, and lysed by sonication. OMPs were extracted with sodium lauroylsarcosinate (Sigma, Spain) and recovered by ultracentrifugation as previously described.¹² The OMP profiles were determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 10% SDS gels and 6 µg protein of OMPs, followed by Simply Blue SafeStain gel (Invitrogen, Spain).

Membrane permeability assays

Bacterial cells were grown in LB Broth and incubated in absence or presence of 1 mg/L rafoxanide for 24 h. Pellet was harvested by ultracentrifugation at 4600g for 15 min. Bacterial cells were washed with PBS 1X and after centrifugation in the same condition described before, (i) pellet was resuspended in 100 µL of PBS 1X containing 10 µL of Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) (Invitrogen, USA). After 10 min of incubation, (i) 10 µL of pellet was placed into a slide to visualize by Leica fluorescence microscope (DM-6000; Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany), and (ii) 100 µL was placed into a 96-well plate to measure fluorescence at 0, 10, 15, 20, 30, 40, 70, 100 and 130 min using Typhoon FLA 9000 laser scanner (GE Healthcare Life Sciences, USA) and quantified by ImageQuant TL software (GE Healthcare Life Sciences, USA).

Transmission electron microscopy visualization

Bacterial cells were grown in LB Broth, incubated in absence or presence of 1 mg/L rafoxanide for 24 h. Pellet was harvested by ultracentrifugation at 4600g for 15 min and resuspended in 2.5 % glutaraldehyde containing 0.1M cacodylate buffer in order to fix the samples. After three rounds of centrifugation in the same condition described above and washed with 0.1M cacodylate buffer, pellet was included in agarose resin by automatic processor and ultrathin sections were obtained by ultramicrotome. These sections were placed into a grid to visualize by Zeiss Libra 120 transmission electron microscope.

Zeta potential measurements

Zeta potential measurements were performed as we previously described.¹³ Briefly, the bacterial surface was cleansed by washing twice with Milli-Q water, resuspended in Milli-Q water at 1×10^8 CFU/mL, and diluted 10-fold in the same medium immediately

CAPÍTULO II. Artículo 3

prior to zeta potential measurement. The resulting suspensions were used to fill clear disposable folded capillary zeta cells (Malvern, UK). To examine the effect of rafoxanide treatment on Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains, 1 mg/L rafoxanide was added to 5 mL of bacterial culture at 1×10^8 CFU/mL, then incubated in a shaking bath (37°C, 180 rpm) for 20 min and prepared for zeta potential analysis as described above. The zeta potential measurement (mV) of bacterial cells was measured at 25°C with a zeta potential analyzer at 150 V (Zetasizer Nano ZS; Malvern Instruments, Malvern, UK).

Reactive oxygen species (ROS) detection

Detection of ROS was performed as described previously with minor modifications.¹⁴ Briefly, fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich), was used to examine the levels of ROS. Initial inoculums of 1×10^6 CFU/mL in minimal medium (M9) supplemented with glucose and magnesium sulfate were incubated, in absence or presence of 1 mg/L rafoxanide, 100 mg/L rafoxanide, 0.5xMIC colistin and 0.5xMIC colistin in combination with 1 mg/L rafoxanide with 10 µM DCFH-DA in 96-well plate to determine the bacterial density and fluorescence using CLARIOstar Plus (BMG Labtech). Bacterial density was determined at OD_{600nm} and fluorescence was determined using excitation/emission wavelengths 485/535 nm. Data were normalized to a no-dye control (background fluorescence) and OD_{600nm} (bacterial density) at 6, 20 and 24 h of incubation. Twelve replicas per condition were measured in two independent experiments. Ampicilin at 1 mg/mL was used as a positive control.

Animals

Immunocompetent C57BL/6 female mice weighing 18 to 20 g were obtained from the University of Seville facility. All mice had the sanitary status of murine pathogen free and were assessed for genetic authenticity and housed in regulation cages with food and water ad libitum. This study was carried out in strict accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University Hospital of Virgen del Rocío of Seville, Spain (approval 1542-N-16). All surgery was performed under sodium thiopental anesthesia and all efforts were made to minimize suffering.

CAPÍTULO II. Artículo 3

Rafoxanide *in vivo* toxicity

The Reed and Muench method was used.¹⁵ Groups of 6 mice were intravenously (iv.) administered with a single dose of rafoxanide, starting at 10 mg/kg 0.2 mL injectable water, and the solution were serially duplicated until 100% mortality was reached.

***A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* peritoneal sepsis models**

Murine peritoneal sepsis models with Col-R *A. baumannii* CR17, *P. aeruginosa* M5 and *K. pneumoniae* Kp21 strains were established by intraperitoneal (ip.) inoculation of the bacteria in immunocompetent and neutropenic mice.¹⁶ The minimal bacterial lethal dose 100 (MLD100) was determined by inoculating various groups of mice (6 mice per group) with decreasing amounts of these strains inoculum from 8 to 6, 9 to 8, 9 to 7 log₁₀ CFU/mL, respectively, and monitoring the survival of the mice for 7 days.

Therapeutic effect of rafoxanide in monotherapy and in combination with colistin in immunocompetent murine models of peritoneal sepsis

A murine peritoneal sepsis model was established by ip. inoculation of mice with Col-R *A. baumannii* CR17, *P. aeruginosa* M5 and *K. pneumoniae* Kp21 strains and treatment with rafoxanide monotherapy, CMS monotherapy or rafoxanide and CMS in combination. Briefly, animals were infected ip. with 0.5 mL of the MLD100 of each strain (7.2, 8.5 and 7.5 log CFU/mL, respectively). One hundred fifty-one mice were randomly ascribed to the following groups: (i) controls (without treatment); (ii) CMS administered ip. at 20 mg/kg/8 h, 4 h after bacterial inoculation, for 72 h; (iii) rafoxanide administered iv. at 10 mg/kg/24 h, 4 h after bacterial inoculation, for 72 h; and (iv) CMS administered ip. at 20 mg/kg/8 h plus rafoxanide administered iv. at 10 mg/kg/24 h, 4 h after bacterial inoculation, for 72 h. Mortality was recorded over 72 h. After death or sacrifice of the mice at the end of the experimental period, aseptic thoracotomies were performed and blood samples were obtained by cardiac puncture. The spleen and lungs were aseptically removed and homogenized (Stomacher 80; Tekmar Co., USA) in 2 mL of sterile 0.9% NaCl solution. Ten-fold dilutions of the homogenized spleen and lungs, and blood were plated onto sheep blood agar for quantitative cultures. We used rafoxanide at 10 mg/kg iv. because previous pharmacokinetic studies revealed that 10 mg/kg of rafoxanide administered iv. to goat presented a C_{max} of 87.63 ± 11.71 mg/L¹⁷, that exceed the rafoxanide synergistic concentration (1 mg/L).

CAPÍTULO II. Artículo 3

Immunosuppressed mice

Immunosuppressed mice were obtained after cyclophosphamide treatment following the protocol of Zuluaga *et al.*¹⁸ Immunocompetent C57BL/6 female mice were treated with two doses of cyclophosphamide. Mice were treated at day 1 with 150 mg/kg and with 100 mg/kg at day 4. Once mice were compromised, bacterial inoculation of Col-R strains *A. baumannii* CR17, *P. aeruginosa* M5 and *K. pneumoniae* Kp21 was performed at day 5.

Flow cytometry

Blood cells were obtained from control mice and mice treated with cyclophosphamide as described above. After the treatment with 150 and 100 mg/kg of cyclophosphamide at day 1 and 4, blood cells were isolated at day 5 and 7. Briefly, blood samples were harvested from mouse periorbital plexuses and resuspended in EDTA and then red blood cells were depleted by lysis in a lysis buffer containing 0.15 M NH₄Cl, 0.01 M KHCO₃ and 0.01 M of disodium-EDTA for 10 min at room temperature. Cells (1-2 x 10⁶ cells per sample) were resuspended in PBS with 2% FBS and then incubated with the appropriate dilution of antibody conjugates. Samples were analyzed with LSRFortessa Flow Cytometer (BD Biosciences, USA) and data obtained were analyzed with DIVA software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). The staining protocols included combination of the following antibodies: anti-CD11b (clone M1/70, APC) and anti-Ly6C (clone, AL-21, FITC) purchased from Biolegend (Spain), anti-Ly6G (clone 1A8, PE) anti-CD11c (clone N418, BV421) and anti-I-A/I-E (clone M5/114.15.2) purchased from BD Bioscience (Spain). All antibodies were diluted at 1:300 in PBS with 2% fetal bovine serum.

Therapeutic effect of rafoxanide in immunosuppressed murine models of peritoneal sepsis

The immunosuppressed murine peritoneal sepsis models by *A. baumannii* CR17, *P. aeruginosa* M5 and *K. pneumoniae* Kp21 strains were established by ip. inoculation of the bacteria in immunosuppressed mice. Briefly, animals (7-15 mice for each group) were infected ip. with 0.5 mL of each strain (7.2, 8.5 and 7.5 log CFU/mL, respectively). Rafoxanide therapy, mortality and bacterial loads in tissues and blood were determined as in “Therapeutic effect of rafoxanide in monotherapy and in

CAPÍTULO II. Artículo 3

combination with colistin in immunocompetent murine models of peritoneal sepsis” section.

REFERENCES

1. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter). *J Bacteriol* 1968; **95**:1520-41.
2. Holloway IW. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 1955; **13**:572-681.
3. Reading C, Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; **11**:852-7.
4. Valencia R, Arroyo LA, Conde M et al. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; **30**:257-63.
5. López-Rojas R, McConnell MJ, Jiménez-Mejías ME et al. Colistin resistance in a clinical *Acinetobacter baumannii* strain appearing after colistin treatment: Effect on virulence and bacterial fitness. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57(9)**:4587-9.
6. Maciá MD, Mena A, Borrell N et al. Increased susceptibility to colistin in hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains from chronic respiratory infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51(12)**:4531-42.
7. Pachón-Ibáñez ME, Labrador-Herrera G, Cebrero-Cangueiro T et al. Efficacy of colistin and its combination with rifampin *in vitro* and in experimental models of infection caused by carbapenemase-producing clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol* 2018; **9**:912.
8. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. European antimicrobial breakpoints. Basel: EUCAST, 2019
9. Stokes JM, MacNair CR, Ilyas B et al. Pentamidine sensitizes Gram-negative pathogens to antibiotics and overcomes acquired colistin resistance. *Nat Microbiol* 2017; **2**:17028.
10. Smani Y, Domínguez-Herrera J, Pachón J. Rifampin protects human lung epithelial cells against cytotoxicity induced by clinical multi and pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis* 2011; **203**:1110-9.
11. Ayerbe-Algaba R, Gil-Marqués ML, Jiménez-Mejías ME et al. Synergistic activity of niclosamide in combination with colistin against colistin-susceptible and

CAPÍTULO II. Artículo 3

- colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; **8**:348.
12. Parra-Millán R, Vila-Farrés X, Ayerbe-Algaba R et al. Synergistic activity of an OmpA inhibitor and colistin against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanistic analysis and *in vivo* efficacy. *J Antimicrob Chemoter* 2018; **73(12)**:3405-12.
 13. Soon R. L, Nation R. L, Cockram S. et al. Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011 **66**: 126-133.
 14. Recacha E, Machuca J, Díaz de Alba P, et al. Quinolone resistance reversion by targeting the SOS response. *mBIO* 2017 **10**;8(5). pii: e00971-17.
 15. O'Reilly T, Cleeland R, Squires EL. Evaluation of antimicrobials in experimental animal infections. *Antibiotics in laboratory medicine* (eds. Williams and Wilkins) 604-765 (Lorian, 1996).
 16. Vila-Farrés X, Parra-Millan R, Sanchez-Encinales V et al. Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. *Sci Rep* 2017; **7**:14683.
 17. Pal S, Chandra Debnath S, Kumar Das S et al. The Pharmacokinetics of Rafoxanide following Single Dose Intravenous and Oral Administration in Goats. *IJPT* 2004; **3(1)**:26-9.
 18. Zuluaga AF, Salazar BE, Rodriguez CA et al. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect Dis* 2016; **6**:55

CAPÍTULO II. Artículo 3

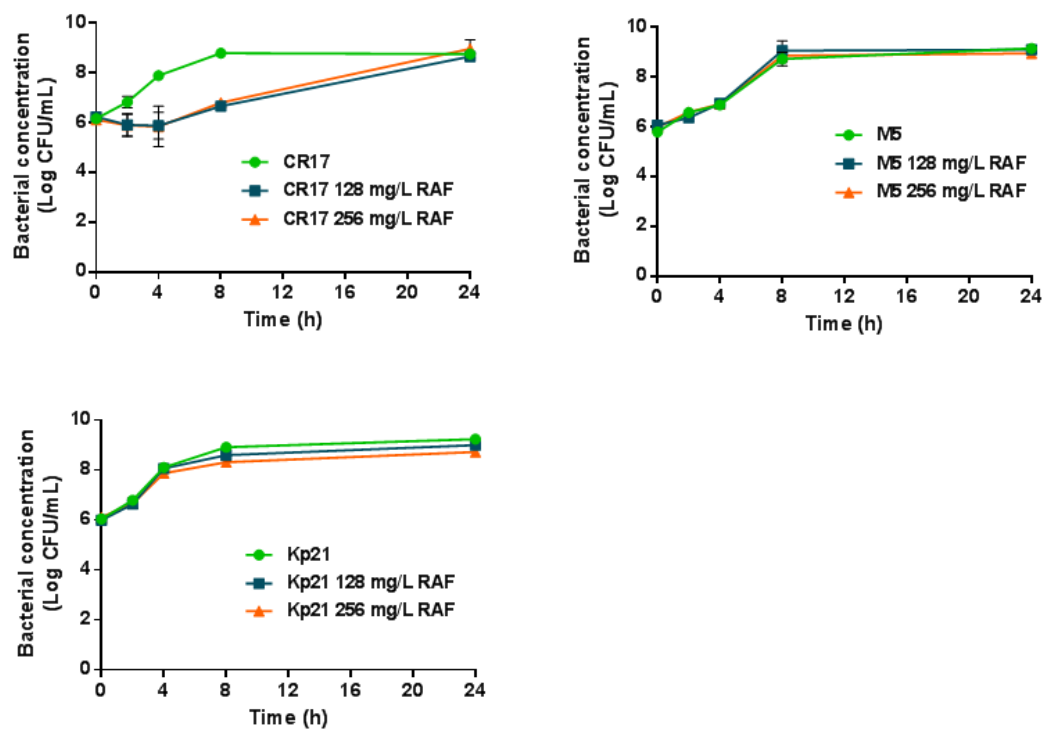


Figure S1. Time-kill curve of Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* in presence of rafoxanide at higher concentrations. Time-kill curves of Col-R *A. baumannii* CR17, *P. aeruginosa* M5, and *K. pneumoniae* Kp21 strains in presence of 128 and 256 mg/L rafoxanide for 24 h. RAF: rafoxanide. Data are represented as mean \pm SEM from two independent experiments.

CAPÍTULO II. Artículo 3

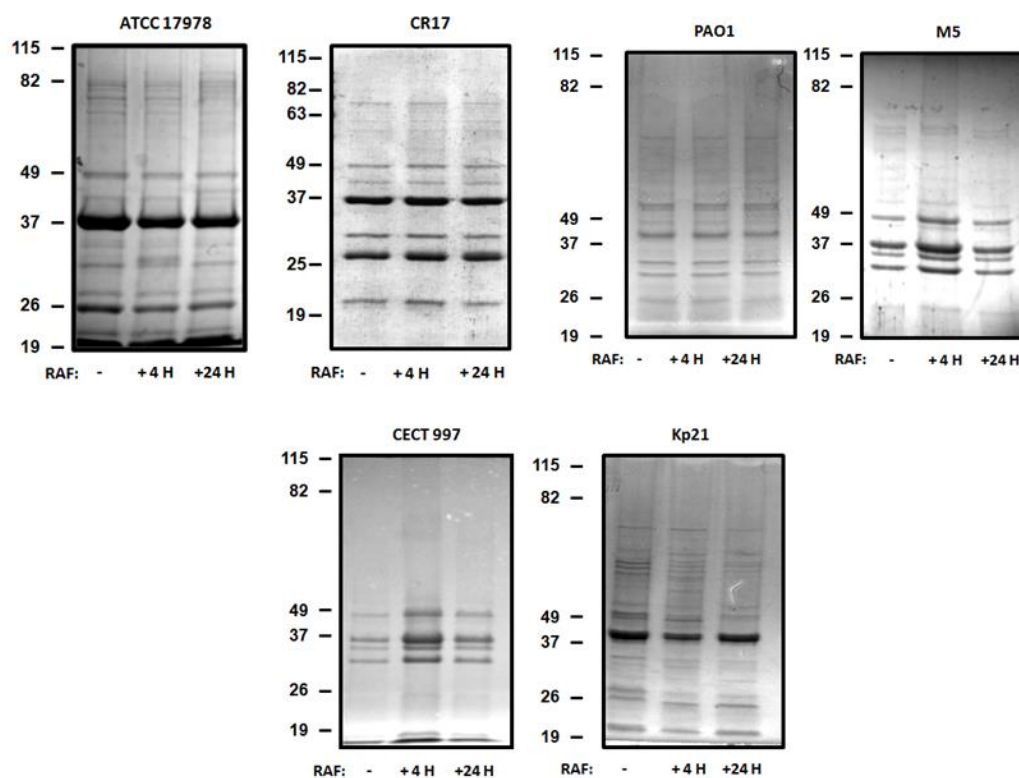


Figure S2. Outer membrane proteins (OMPs) profile of Col-S and Col-R *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in presence of rafoxanide. OMPs profile of Col-S and Col-R *A. baumannii* (ATCC 17978 and CR17), Col-S and Col-R *P. aeruginosa* (PAO1 and M5), and Col-S and Col-R *K. pneumoniae* (CECT 997 and Kp21) strains in presence of 1 mg/L rafoxanide for 4 and 24 h. RAF: rafoxanide.

CAPÍTULO II. Artículo 3

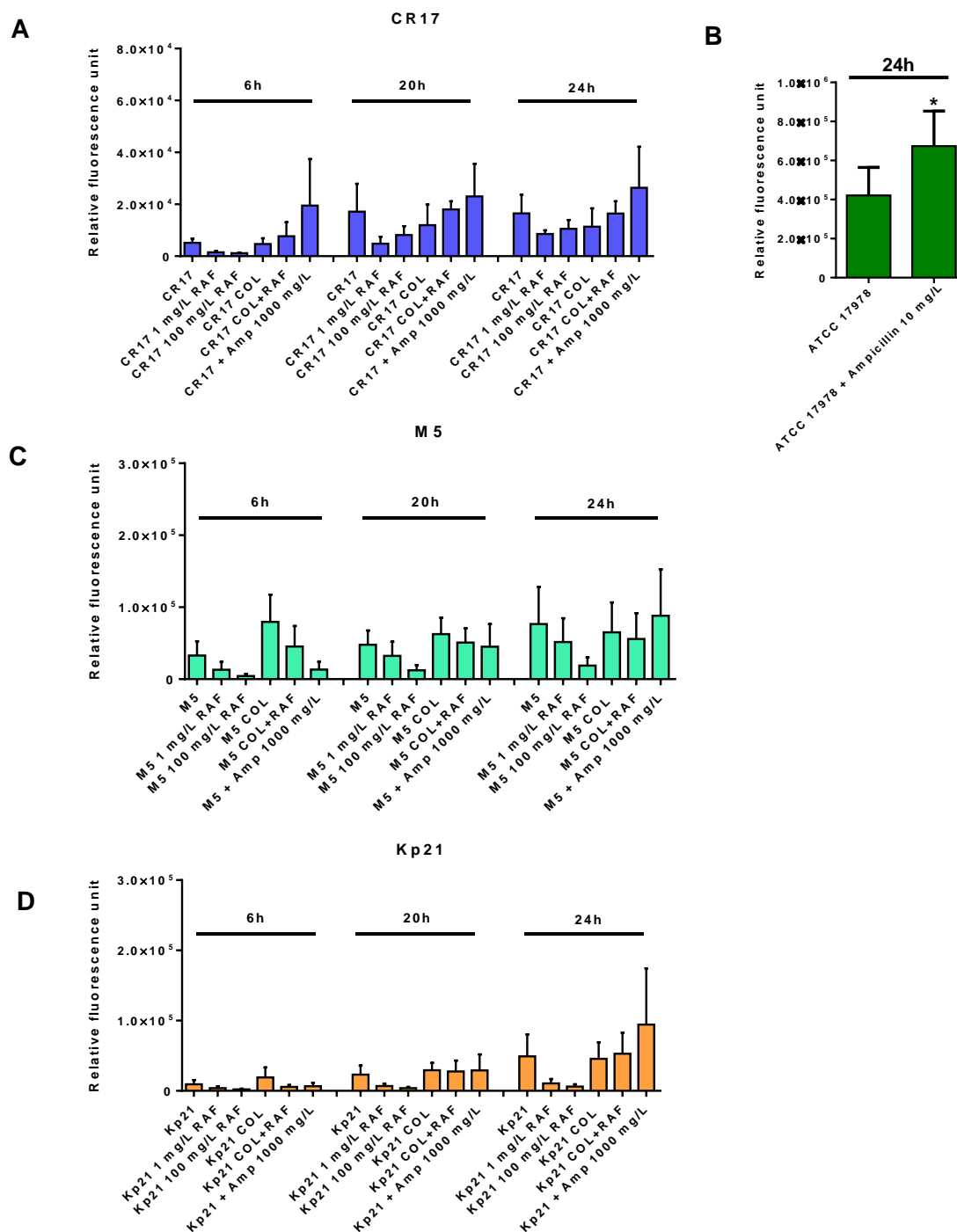


Figure S3. Reactive oxygen species production after rafoxanide treatment during 6, 20 and 24 hours of *A. baumannii* Col-R CR17 (A) and Col-S ATCC 17978 (B), *P. aeruginosa* Col-R M5 (C), and *K. pneumoniae* Col-R Kp21(D). RAF: rafoxanide. COL: Colistin 0.5xMIC. COL+RAF: Colistin 0.5xMIC and Rafoxanide at 1 mg/L. Data are represented as mean \pm SEM from twelve replicates in three independent experiments. *P<0.05: treatment vs. control.

CAPÍTULO II. Artículo 3

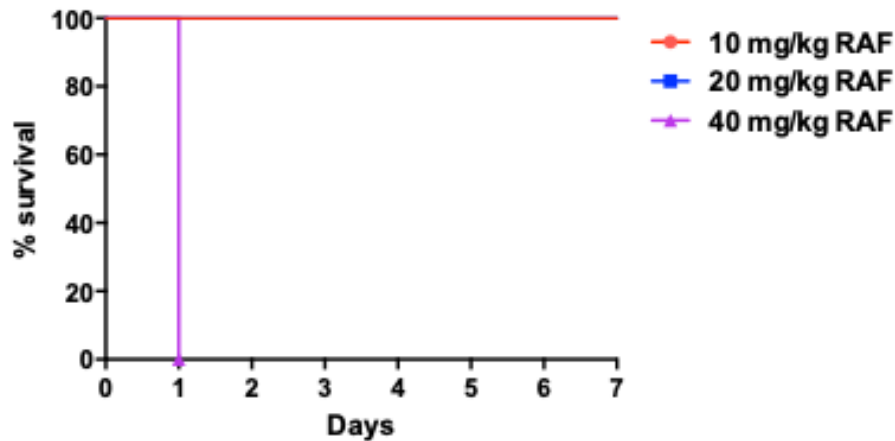


Figure S4. Survival rates of mice treated with different doses of rafoxanide. Six mice per group were treated with one dose of 10, 20 and 40 mg/kg rafoxanide. Mice survival rates were analyzed using Kaplan Meier curves.

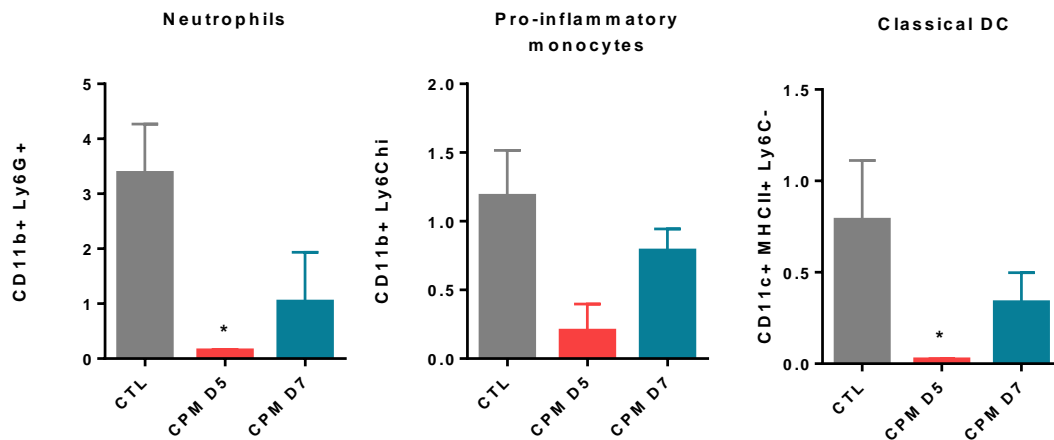


Figure S5. Blood immune cells percentages in immunosuppressed mice. Neutrophils, pro-inflammatory monocytes and classical dendritic cells were identified as CD11b+Ly6Chi, CD11b+Ly6G+ and CD11c+ MHCII+ Ly6C-, respectively, by flow cytometry in blood of mice immunosuppressed by cyclophosphamide during 4 days. Data are representative of 3-7 mice per group, represented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$: CPM D5 or D7 vs. CTL. CTL: non-immunosuppressed mice. CPM: cyclophosphamide.

CAPÍTULO II. Artículo 3

Table 1. MIC of Col-S and Col-R strains and the colistin resistance mechanism.

Strain	MIC (mg/L)	Resistance	Reference/Sourece
ATCC 17978	0.25	Col-S reference strain	1
Ab9	0.125	Col-S clinical isolate ST297	REIPI collection
Ab186	0.25	Col-S clinical isolate ST2	REIPI collection
Ab5	0.125	Col-S clinical isolate ST186	REIPI collection
Ab10	1	Col-S clinical isolate ST252	REIPI collection
Ab12	0.25	Col-S clinical isolate ST2	REIPI collection
Ab13	0.125	Col-S clinical isolate ST79	REIPI collection
Ab325	0.125	Col-S clinical isolate	REIPI collection
Ab326	0.25	Col-S clinical isolate	REIPI collection
Ab327	0.125	Col-S clinical isolate	REIPI collection
Ab328	0.125	Col-S clinical isolate ST2	REIPI collection
#1	≥512	PDR clinical isolate with A236E amino acid substitution of pmrB	4
#10	≥512	PDR clinical isolate with F387Y and S403F amino acids substitution of pmrB	4
#11	256	PDR clinical isolate with R263C amino acid substitution of pmrB	4
#14	512	PDR clinical isolate with R263C amino acid substitution of pmrB	4
#16	≥512	PDR clinical isolate with S403F amino acid substitution of pmrB	4
#17	512	PDR clinical isolate with R263C amino acid substitution of pmrB	4
#19	≥512	PDR clinical isolate with T13A and S17G amino acids substitution of pmrB	4
#20	64	PDR clinical isolate with A227V and M308T amino acids substitution of pmrB	4

A. baumannii

CAPÍTULO II. Artículo 3

<i>P. aeruginosa</i>	#22	128	PDR clinical isolate with P170Q amino acid substitution of pmrB	4
	#24	128	PDR clinical isolate with R263C amino acid substitution of pmrB	4
	#99	64	PDR clinical isolate with A227V amino acid substitution of pmrB	4
	#113	256	PDR clinical isolate with L5S, R207C and G426S amino acids substitution of <i>pmrB</i>	4
	CR17	64	PDR clinical isolate with M12K amino acid substitution of pmrA	5
	PAO1	1	Col-S reference strain	2
	Pa39	1	Col-S clinical isolate ST1110	REIPI collection
	Pa238	2	Col-S clinical isolate ST111 producing VIM-2	REIPI collection
	Pa20	0.125	Col-S clinical isolate	HUVR collection
	Pa43	1	Col-S clinical isolate	HUVR collection
	Pa62	0.5	Col-S clinical isolate	HUVR collection
	Pa76	0.25	Col-S clinical isolate	HUVR collection
	Pa90	2	Col-S clinical isolate	HUVR collection
	Pa110	1	Col-S clinical isolate	HUVR collection
	Pa130	0.25	Col-S clinical isolate	HUVR collection
	Pa158	1	Col-S clinical isolate	HUVR collection
	M1	512	PDR clinical isolate with L70R aminoacids substitution of pmrA and V184I; G220D; R286Q; and Y344H aminoacids substitutions of pmrB	6
	M4	32	PDR clinical isolate with L70R aminoacids substitution of pmrA, R286Q; L322P and Y344H deletion nucleotides (D aminoacid 46) of pmrB and L50P aminoacids substitution of phoQ	6
	M5	512	PDR clinical isolate with L70R aminoacids substitution of pmrA and V5A; L171P; R286Q; L322P and Y344H aminoacids substitutions of pmrB	6
Pa82	32	ND	REIPI collection	
Pa440	256	ND	REIPI collection	

CAPÍTULO II. Artículo 3

<i>K. pneumoniae</i>	Pa564	8	ND	REIPI collection
	CECT 997	0.5	Col-S reference strain	3
	C1-4	0.5	Col-S clinical isolate ST 45	HUVR collection
	C1-10	0.5	Col-S clinical isolate ST unknown	HUVR collection
	C1-14	2	Col-S clinical isolate ST 36	HUVR collection
	C1-25	2	Col-S clinical isolate ST 77	HUVR collection
	C1-27	2	Col-S clinical isolate ST 785	HUVR collection
	C1-30	1	Col-S clinical isolate ST unknown	HUVR collection
	C1-35	1	Col-S clinical isolate	HUVR collection
	C1-39	2	Col-S clinical isolate ST 1245	HUVR collection
	C1-40	2	Col-S clinical isolate ST 247	HUVR collection
	C1-42	0.5	Col-S clinical isolate ST 1412	HUVR collection
	Kp07	2	Col-S clinical isolate ST 1603 producing VIM-1	7
	Kp21	32	Clinical isolate containing IS1 transposase insertion at nucleotide 22 of mgrB	7
	Kp28	4	Clinical isolate with G56E amino acid substitution of pmrA, and A245T amino acid substitution of pmrB	7
	Kp29	16	Clinical isolate with G56E and M215I amino acids substitution of pmrA, and R63P; S68N and R255G amino acids substitution of pmrB	7
	C1-259	32	ND	HUVR collection
C1-264	32	ND	HUVR collection	
C1-266	32	ND	HUVR collection	

VI. DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

La resistencia antimicrobiana supone una amenaza a nivel global y por ello se requiere de la implantación de medidas para frenar su avance y nuevas estrategias para combatirla. La aparición y propagación de mecanismos de resistencia a nivel mundial ha supuesto que infecciones que anteriormente eran fácilmente tratables, sean ahora un problema de salud pública y comporten altas tasas de mortalidad. De hecho, si la situación no revierte, en el año 2050 se estima que es posible llegar a alcanzar los 10 millones de muertes, cifras superiores a la mortalidad atribuida a otras causas como el cáncer o los accidentes de tráfico (14). Entre los grupos de patógenos con más relevancia clínica se encuentran los BGN, incluyendo *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacterales* como *E. coli* y *K. pneumoniae*. El aumento de mecanismos de resistencia y su transmisión hace difícil el tratamiento de infecciones por estas bacterias, por ello la OMS los ha considerado patógenos para los cuales el desarrollo y la investigación de nuevos agentes antimicrobianos es una prioridad crítica (10). Además, también pertenecen al grupo ESKAPE, patógenos causantes de infecciones nosocomiales relevantes debido al elevado número de factores de virulencia que presentan (41). En virtud de esta situación, en la actualidad se están desarrollando distintas estrategias antimicrobianas como el uso de antiguos antibióticos que habían quedado olvidados, la fagoterapia, inhibidores de factores de virulencia, el reposicionamiento de fármacos o la inmunoterapia. Todas ellas pueden desarrollarse para su uso en monoterapia, o bien como adyuvantes al tratamiento antimicrobiano de elección.

En este contexto, esta tesis doctoral se centra en el estudio de fármacos reposicionados para combatir infecciones causadas por BGN. La mayor ventaja de esta estrategia radica en la reducción de costes y de tiempo que supone frente al desarrollo tradicional de nuevos fármacos. El tiempo aproximado para la salida al mercado de un fármaco reciclado es de entre 3-12 años mientras que para un nuevo medicamento puede llegar a ser de 17 años (380, Figura 17). A su vez, los costes también se reducen significativamente siendo de 1,6 billones de dólares en comparación con los 12 billones necesarios usando la estrategia tradicional (397). Además, otra de las ventajas que supone el reposicionamiento es que, debido a que son fármacos ya aprobados por la FDA, la información sobre características farmacológicas del fármaco incluyendo la toxicidad, la farmacocinética y la farmacodinamia están disponibles en ensayos preclínicos y clínicos.

DISCUSIÓN GENERAL

Asimismo, cabe destacar que el reposicionamiento de fármacos está ganando interés en muchos campos de la biomedicina, hecho que se refleja con el auge de la búsqueda del tema “*Drug repurposing*” en el portal PubMed, habiéndose multiplicado por diez desde 2011 a 2019.

Siguiendo esta línea, el objetivo general de esta tesis doctoral es el estudio de fármacos reposicionados en monoterapia o como tratamiento adyuvante así como el estudio de su mecanismo de acción mediante la modulación del sistema inmune del huésped o la alteración de la pared celular bacteriana. Los fármacos candidatos a ser investigados fueron el anticancerígeno tamoxifeno y el antihelmíntico rafoxanida.

Capítulo I. Reposicionamiento del tamoxifeno como estrategia antimicrobiana.

Como se muestra en el artículo 1 de esta tesis doctoral, los fármacos reposicionados para tratar infecciones bacterianas pueden actuar a nivel bacteriano inhibiendo el crecimiento del patógeno o sus factores de virulencia como proteínas de la membrana externa, *quorum sensing*, *biofilm*, entre otros; o bien pueden actuar frente al huésped modificando la respuesta inmune del mismo, facilitando la resolución de la infección. En el artículo 2 de esta tesis doctoral, se aportan datos sobre la actividad antibacteriana del tamoxifeno y sus metabolitos frente a BGN. Este trabajo evidencia el papel del tamoxifeno en la regulación del tráfico de las células del sistema inmune después de la infección bacteriana reduciendo la hiperinflamación producida durante la sepsis, y su actividad antibacteriana *in vivo* debido a la actividad bactericida de sus tres metabolitos mayoritarios frente a estos patógenos.

Varios estudios se han centrado en la modulación del sistema inmune como terapia antimicrobiana ya sea regulando el tráfico de las células implicadas o bien modificando su estado de activación y/o su función (398). La migración de monocitos pro-inflamatorios y neutrófilos es crucial para la defensa del huésped frente a un amplio rango de patógenos (285,399). En esta tesis doctoral se muestra la importancia que tiene la regulación de la migración de ambos tipos celulares en respuesta a la infección por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (Figura 1, Artículo 2, Capítulo I) y el papel del tamoxifeno en la regulación de este proceso (Figura 4, Artículo 2, Capítulo I). Otras moléculas han mostrado capacidad de modificar la migración y la función de células de la inmunidad innata. El aporte exógeno de LPC, componente mayoritario de los fosfolípidos en las células eucariotas, impide la pérdida de función de los neutrófilos en

DISCUSIÓN GENERAL

un modelo de ligación cecal murino aumentando su actividad bactericida, traduciéndose en un aumento de la supervivencia y una disminución de la carga bacteriana (363). También, un nuevo grupo de lípidos, las resolvinas, reducen el reclutamiento de los neutrófilos a los sitios de infección, promueven la fagocitosis bacteriana por parte de estas células y reducen la activación del inflammasoma, incrementando la supervivencia animal un 40% en un modelo murino de sepsis por *E. coli* (400,401). Cabe destacar que las resolvinas, igual que el tamoxifeno, no presentaron actividad bactericida o bacteriostática *in vitro* frente a las cepas de estudio.

Dentro de los fármacos inmunomoduladores, consideramos el tamoxifeno como un candidato prometedor para ser reposicionado. El tamoxifeno es un modulador del receptor de estrógenos usado tradicionalmente para el tratamiento del cáncer de mama. Su mecanismo de acción consiste en antagonizar el receptor de estrógenos de las células cancerígenas de la mama, inhibiendo importantes señales proliferativas (402). Estudios anteriores han demostrado que el tamoxifeno presenta actividad inmunomoduladora en células T (403) pero además, la unión del receptor de estrógenos a su ligando, regula células de la inmunidad innata y promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de células dendríticas y macrófagos en respuesta a la estimulación de los TLR (404). Debido a que la sepsis se considera un desorden causado por una respuesta inflamatoria incontrolada y exacerbada del huésped y que el receptor de estrógenos contribuye en procesos inflamatorios, su inhibición podría moderar esta respuesta. Además, se ha visto que el tamoxifeno presenta sitios de acción independientes al receptor de estrógenos ya que puede unirse a proteínas encargadas de la transducción de señales como la proteína quinasa C (PKC) e intervenir en la expresión de las MAPK (405,406). En cuanto a su papel en las enfermedades infecciosas, el tamoxifeno también presenta actividad antimicrobiana frente a hongos, *Mycobacterium tuberculosis* y bacterias grampositivas tanto *in vitro* como *in vivo* (407-409). Además, también estimula la respuesta inmune del huésped frente a la infección aumentando la producción de NETs en respuesta a *S. aureus* (396). Por todo ello, fue el candidato de elección para estudiar su actividad frente *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Siguiendo la misma estrategia, actualmente el tamoxifeno está siendo estudiado para su reposicionamiento como tratamiento de otros tipos de tumores incluyendo el glioblastoma multiforme o el tumor desmoide, y en otros campos de la medicina como la psiquiatría para tratar el trastorno bipolar (410-412).

DISCUSIÓN GENERAL

Se ha visto que el tamoxifeno reduce la transcripción y la expresión de MCP-1, quimioquina implicada en la migración de monocitos desde la médula ósea hasta la sangre, en células endoteliales de la arteria coronaria y células endometriales cancerígenas (413,414). En nuestro estudio se muestra que el tamoxifeno reduce la liberación de MCP-1 *in vivo*, así como la liberación de IL-18 y la fosforilación de ERK (proteínas implicadas en su vía de señalización), produciendo en última instancia una reducción en la migración de células de origen mieloide, monocitos y neutrófilos desde la médula ósea hasta la el torrente sanguíneo (Figura 3 y 4, Artículo 2, Capítulo I).

Estudios en *L. monocitogenes* han demostrado que la migración de monocitos desde la médula ósea hasta la sangre es dependiente de la unión de MCP-1 con su ligando CCR2 presente en la superficie de estas células (305). Mediante el uso de ratones *knock out* (KO) para MCP-1, hemos visto que esta quimioquina participa en la migración tanto de monocitos como de neutrófilos en respuesta a la infección por los tres patógenos de estudio (Figura 2, Artículo II, Capítulo I). Aunque está ampliamente aceptado que la salida de los neutrófilos de la médula ósea depende únicamente de las quimioquinas MIP-1 (del inglés, *macrophage inflammatory proteins*) y KC (del inglés, *keratinocyte chemoattractant*), ligandos del receptor CXCR2 (303), nuestros resultados muestran por primera vez la implicación de MCP-1 en este proceso. Debido a que los neutrófilos también presentan expresión del receptor CCR2 (aunque en menor medida que los monocitos) (415), es posible que MCP-1 también esté implicada en la regulación del tráfico de estas células. En concordancia, Balamayooran *et al.* demostraron que la migración de los neutrófilos desde sangre a pulmón en un modelo murino de neumonía por *E. coli* es dependiente de MCP-1 (416). Sin embargo, la eliminación de MCP-1 con el uso de ratones KO no inhibe por completo la migración de monocitos y neutrófilos, indicando que existen vías alternativas implicadas en el proceso. Acorde con nuestros resultados, estudios publicados anteriormente en ratones deficientes en MCP-1, indican que el reclutamiento de monocitos en respuesta a la infección por *L. monocitogenes* se reduce sólo entre un 40-50% (306). Esta inhibición parcial del tráfico celular, es debida a la presencia de un segundo ligando para el receptor CCR2, llamado MCP-3 (288). En el caso de los neutrófilos, aunque en nuestro estudio no se haya medido la expresión de MIP-1 y KC, parte de la migración posiblemente es dependiente de ambas quimioquinas.

Debido al papel del tamoxifeno en la reducción de los niveles de MCP-1 y en la migración celular, se estudió la movilización de monocitos y neutrófilos en ratones KO

DISCUSIÓN GENERAL

tratados con el fármaco e infectados con *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (Figura 5, Artículo 2, Capítulo I). Se observó que la migración celular disminuyó en ratones tratados con tamoxifeno, pero ésta no se redujo completamente, indicando que el tamoxifeno regula otras vías independientes o alternativas a MCP-1. Una posible explicación podría ser que la reducción de MCP-1 por parte del tamoxifeno, pusiera en marcha la regulación de mecanismos compensatorios como el aumento de expresión de MCP-3, con la finalidad de contrarrestar el efecto producido por el fármaco. Los mecanismos transcripcionales del gen *mcp-1* se han estudiado en detalle, presentado dos sitios conservados para la unión de NF- κ B. Sin embargo, los mecanismos transcripcionales del gen *mcp-3* son poco conocidos (417). En este contexto, son necesarios más estudios con la finalidad de determinar cuáles son las vías independientes a MCP-1 implicadas en este proceso.

Por otro lado, el tamoxifeno también disminuye los niveles de IL-18, como parte de la vía de señalización de MCP-1 (Figura 3, Artículo 2, Capítulo I). La activación del receptor NLRP3 (del inglés *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*), perteneciente a la vía del inflamasoma, finaliza en la digestión de IL-1 β e IL-18 en sus formas activas. En el caso de *P. aeruginosa*, la eliminación de IL-18 mediante ratones KO redujo la carga bacteriana en pulmones y su diseminación en un modelo de neumonía. A su vez, el tratamiento de ratones WT con un anticuerpo anti-IL-18 presentó resultados similares (418). De la misma manera, la disminución de IL-18 debido al tratamiento con tamoxifeno podría estar reduciendo la diseminación bacteriana junto con el efecto sobre la migración de monocitos y neutrófilos descrito en este trabajo. Además, curiosamente, en este estudio hemos observado que la infección por *P. aeruginosa* produce una mayor liberación de IL-18 en comparación con el resto de patógenos y que el tamoxifeno reduce estos niveles de manera más acentuada.

La reducción del tráfico de monocitos y neutrófilos después del tratamiento con tamoxifeno tiene como consecuencia la disminución de ambos tipos celulares en sangre y en tejidos colindantes, así como una disminución de macrófagos y células dendríticas originadas a partir de monocitos. A pesar de que el número de macrófagos y de neutrófilos es presumiblemente menor, nuestros ensayos *in vitro* indican que la función bactericida de estas células frente *A. baumannii* y *E. coli* incrementa después de la incubación con tamoxifeno (Figura S3, Artículo 2, Capítulo I).

Se conoce que los monocitos pro-inflamatorios son precursores de un subtipo de células dendríticas llamadas TipDC (419). Estas células fueron descritas por primera vez en

DISCUSIÓN GENERAL

respuesta a la infección por *L. monocytogenes* y se caracterizan por una elevada producción de TNF- α e iNOS. Debido a su relación con los monocitos pro-inflamatorios, su migración también es dependiente de CCR2 y MCP-1 (299). Varios estudios muestran la importancia de estas células en la resolución de la infección por *L. monocytogenes*, principalmente debido a que TNF- α e iNOS son esenciales para el aclaramiento de la infección por este patógeno en modelos murinos (420,421). Por lo tanto, las TipDC son importantes mediadores de la inmunidad innata en respuesta a la infección por *L. monocytogenes*. Por el contrario, otro estudio afirma que la reducción de monocitos pro-inflamatorios y TipDC disminuye la patogenicidad de la infección en un modelo murino de *Trypanosoma brucei* debido a la reducción de TNF- α y NO, moléculas que contribuyen a la producción de daño tisular (422). La contradicción de estos resultados sobre la implicación del reclutamiento de monocitos y TipDC en la supervivencia del huésped podría explicarse por la diferencia en la localización celular de cada patógeno, siendo *L. monocytogenes* un patógeno intracelular mientras que *T. brucei* se encuentra en el plasma (285). En nuestro modelo, las frecuencias de monocitos pro-inflamatorios se ven reducidas, posiblemente produciéndose una menor conversión a TipDC y una menor producción de TNF- α e iNOS. Este hecho puede estar contribuyendo a una mayor supervivencia animal ya que se reduce la hiperinflamación y el daño tisular producido en el modelo de sepsis peritoneal murino por los tres patógenos. Esta afirmación se sustenta en estudios que demuestran que ratones KO para TNF- α e iNOS presentan una menor mortalidad en respuesta a un shock endotóxico por LPS (421,423). Por consiguiente, en nuestro estudio también hemos visto que el tratamiento con tamoxifeno reduce la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6 (datos no enseñados). Además, se ha visto que la incubación de TipDC con tamoxifeno *in vitro*, inhibe su maduración, hecho que se traduce en una menor respuesta al LPS (424). En resumen, el tratamiento con tamoxifeno reduce la migración de monocitos proinflamatorios en un modelo murino de sepsis peritoneal por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, posiblemente reduciendo el número de TipDC y su capacidad de respuesta a LPS, conllevando a una menor producción de citoquinas pro-inflamatorias.

Es importante subrayar, que la eficacia terapéutica del tamoxifeno no sólo se basa en la regulación del sistema inmune, sino que su acción frente a los distintos patógenos también juega un papel importante. Como se ha comentado anteriormente, el tamoxifeno presenta actividad bactericida frente algunas bacterias grampositivas, pero

DISCUSIÓN GENERAL

no presenta actividad *in vitro* frente a las cepas utilizadas en nuestro estudio. Hemos demostrado que el tamoxifeno presenta eficacia terapéutica frente a cepas sensibles y multirresistentes de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, a pesar de que su eficacia en *P. aeruginosa* es ligeramente menor que la observada en el resto de patógenos (Figura 6, Artículo 2, Capítulo I). Sin embargo, la reducción de la migración de las células del sistema inmune desde la médula ósea hacia la sangre es similar en los tres casos. Una posible explicación es que el tratamiento con tamoxifeno implique otras vías independientes a la respuesta inmune. En concordancia, resultados obtenidos en ratones tratados con ciclofosfamida (los cuales presentan bajos niveles de células pertenecientes a la inmunidad innata) y con tamoxifeno, muestran que este último sigue presentando eficacia terapéutica frente *A. baumannii* y *E. coli* pero no frente a *P. aeruginosa* (Figura 7, Artículo 2, Capítulo I). Ha sido ampliamente estudiado que cuando el tamoxifeno se administra como tratamiento para el cáncer de mama, éste es metabolizado por el citocromo P450 a tres metabolitos mayoritarios: el n-desmetiltamoxifeno, el endoxifeno y el 4-hidroxitamoxifeno (425). Nuestros resultados muestran que la mezcla de los tres metabolitos presenta valores de CMI entre 4-16 mg/L y actividad bactericida en las primeras 8 h frente *A. baumannii* y *E. coli in vitro* (Figura 8, Artículo 2, Capítulo I). En el caso de *P. aeruginosa*, los valores de CMI observados fueron más elevados. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos usando ratones inmunodeprimidos, en los cuales se observa que el tamoxifeno presenta un mecanismo adicional a la respuesta inmune pero no para los tres patógenos. Sin embargo, se ha visto que el raloxifeno, un análogo del tamoxifeno, inhibe la producción de piocianina reduciendo la virulencia de *P. aeruginosa* sin afectar a su crecimiento, efecto que se podría estar produciendo también en el caso del tratamiento con tamoxifeno (383).

En resumen, nuestro estudio muestra que el tamoxifeno presenta dos vías de actuación frente a la sepsis causada por BGN. Por un lado, se produce la modificación de la respuesta inmune del huésped, reduciendo la respuesta inflamatoria mediante la disminución de la migración de células de origen mieloide, monocitos y neutrófilos desde la médula ósea hasta el torrente sanguíneo y aumentando la actividad bactericida de macrófagos y neutrófilos. Por otro lado, la metabolización del tamoxifeno a sus tres principales metabolitos, contribuye a la disminución de la carga bacteriana durante la infección debido a la actividad antimicrobiana de los mismos *in vitro*. Se han descrito otras moléculas que, como el tamoxifeno, presentan una función dual. El péptido sintético clavanin-MO, presenta funciones inmunomoduladoras induciendo la

DISCUSIÓN GENERAL

producción de citoquinas anti-inflamatorias y disminuyendo los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, y presenta actividad antibacteriana frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus* multirresistentes (426).

Otro mecanismo de acción del tamoxifeno independiente al receptor de estrógenos y a la respuesta inmune, consiste en la inhibición del tráfico de la toxina Shiga 1 y 2 (STx1 y STx2) de *E. coli* (427). Aunque estas toxinas producen gastroenteritis, en un 5-15% de los pacientes pueden entrar el torrente sanguíneo causando enfermedades potencialmente mortales (428). En los últimos años, la inhibición del tráfico de toxinas se está estudiando como una nueva estrategia terapéutica (429). En un estudio publicado recientemente, se muestra que el tratamiento con tamoxifeno aumenta la supervivencia de ratones expuestos a una dosis letal de ambas toxinas debido a la inhibición de su tráfico intracelular y el impedimento de la muerte celular (427). Toxinas como la proteína uropatogénica específica (Usp), perteneciente a la familia de las bacteriocinas, entre otras, juegan un papel importante en la severidad de la bacteriemia causada por *E. coli* (430). De esta manera, la capacidad del tamoxifeno para inhibir el tráfico de otras toxinas aparte de la toxina Shiga podría suponer una menor virulencia en nuestro modelo de sepsis peritoneal murino por *E. coli* y explicar las diferencias en mortalidad encontradas entre cepas clínicas.

Por último, los datos aportados en nuestro trabajo indican que el tratamiento con tamoxifeno puede ser útil en pacientes con riesgo de infección por BGN, debido a su eficacia como tratamiento profiláctico. Además, estudios *in vitro* muestran que el tamoxifeno presenta sinergia con polimixinas frente *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* (431), sinergia que sería interesante estudiar en un modelo *in vivo*. Otra posible línea de trabajo consiste en el estudio *in vivo* de los metabolitos del tamoxifeno en monoterapia así como la identificación de su diana terapéutica. En cuanto al salto a las primeras fases clínicas, actualmente se está realizando un ensayo clínico con la finalidad de estudiar el uso del tamoxifeno en el ámbito de las enfermedades infecciosas. En este ensayo, se está evaluando la eficacia del tamoxifeno en combinación con anfotericina B para el tratamiento de meningitis criptocócicas (432). Debido a que el tamoxifeno ha sido usado durante muchos años como tratamiento para el cáncer de mama, donde su administración se realiza en dosis bajas pero durante un periodo muy largo de tiempo (entre 5-10 años), este estudio nos aportará información muy útil para ensayos clínicos futuros debido a que la dosis usada ha sido aumentada

DISCUSIÓN GENERAL

hasta 40 veces pero la duración del tratamiento se ha reducido a 14 días, permitiéndonos conocer datos de eficacia y seguridad más adecuados para nuestro objetivo terapéutico.

Capítulo II. Reposicionamiento de rafoxanida como tratamiento antimicrobiano.

El incremento de la resistencia antimicrobiana y el auge de BGN multirresistentes ha provocado el descenso de terapias antimicrobianas disponibles promoviendo el uso de antiguos antibióticos que habían quedado en desuso. Uno de ellos se trata de la colistina, antibiótico que había dejado de usarse en la práctica clínica debido a su alta nefrotoxicidad pero que en la situación actual, se ha convertido en uno de los últimos recursos (331). El crecimiento del uso de este antibiótico en los últimos años, ha aumentado el número de cepas resistentes y su diseminación. Aunque los porcentajes de resistencia a colistina aún no son elevados, en Europa han aumentado del 1,1% en 2003 al 2,2% en 2009, por lo que se considera una amenaza futura a la salud mundial (189). Además, la aparición de resistencia a colistina mediante plásmidos portadores del gen *mcr* sobretodo en *Enterobacterales*, representa un riesgo sustancial para la salud pública (176).

Los antihelmínticos son un grupo de medicamentos usados para tratar enfermedades parasitarias, los cuales se están empezando a investigar para nuevas indicaciones. Dentro de este grupo de fármacos, se encuentra la familia de las salicilanilidas: integrada por la niclosamida, mayoritariamente usada en humanos para tratar infecciones por cestodos (384), y la rafoxanida, oxiclozanida y closantel, usadas más comúnmente en veterinaria (385). Algunos de sus miembros se están evaluando para ser reposicionados, sobre todo en enfermedades infecciosas causadas por otras etiologías como virus, bacterias y hongos, y en otros campos de la medicina como la oncología. Se ha descrito que las salicilanilidas inhiben la replicación del virus del dengue y adenovirus (433,434), presentan actividad frente a bacterias grampositivas y gramnegativas (Artículo 1) así como frente a hongos entre los cuales se encuentra *Cryptococcus neoformans* (435). Además, existen varios estudios sobre la actividad de la niclosamida como anticancerígeno (386,436).

El mecanismo de acción de las salicilanilidas no se conoce en profundidad, pero se cree que actúan como ionoporos capaces de translocar protones a través de la membrana mitocondrial, provocando un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa que inhibe la producción de ATP y, por último, produce la alteración de la motilidad del parásito

DISCUSIÓN GENERAL

(437). Estudios previos han descrito la actividad antibacteriana de las salicilanilidas en bacterias grampositivas como *S. aureus* y *C. difficile* (387,388) y frente al patógeno gramnegativo *H. pylori* (391). Sin embargo, ninguno de los fármacos presentó actividad antibacteriana directa frente a BGN (387,438).

Debido a la acción disruptiva de las salicilanilidas sobre la membrana bacteriana de *H. pylori* y *C. difficile* (388,391) y su posible mecanismo de acción como portador de protones, se hipotetizó que la combinación de rafoxanida y colistina, antibiótico con acción sobre la misma diana, podría restaurar la actividad de la colistina en cepas de BGN resistentes a colistina.

En esta tesis doctoral se muestra que la rafoxanida aumenta la actividad de la colistina en cepas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina, presentando un mayor efecto en las cepas resistentes a colistina (Tabla 1 y Figura 1, Artículo 3, Capítulo II). Estos resultados coinciden con trabajos publicados anteriormente por nuestro grupo, en los cuales se observa que otros miembros de la familia como la niclosamida y la oxiclozanida presentan actividad sinérgica en combinación con colistina en cepas clínicas de BGN sensibles y resistentes a colistina (392,393). Además, en los tres casos (niclosamida, oxiclozanida y rafoxanida), el efecto sinérgico con colistina fue más pronunciado en las cepas resistentes a este antibiótico, reforzando la posible aplicación de estos antihelmínticos en la práctica clínica. En paralelo, Domalaon *et al.* también estudió el efecto sinérgico entre las salicilanilidas y la colistina en BGN obteniendo resultados muy similares, hecho que aumenta la robustez de los datos aportados en este trabajo (439,440). Todos estos estudios indican que el efecto sinérgico frente BGN, no solo se limita a la rafoxanida, sino que se extiende al resto de miembros de la familia.

Se realizaron varios ensayos para conocer el mecanismo de acción del fármaco. Se observó que la incubación con rafoxanida aumentó la permeabilidad de membrana sobre todo en las cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a colistina. Cambios menos acentuados se obtuvieron en las cepas sensibles de ambos patógenos y de *K. pneumoniae*, coincidiendo con el grado de sinergia observado en los ensayos anteriores (Figura 2, Artículo 3, Capítulo II). La acción disruptiva sobre la membrana de cepas resistentes a colistina de los tres patógenos se corroboró usando microscopía de transmisión electrónica (Figura 3A, Artículo 3, Capítulo II). Por lo tanto, aunque estos cambios en la permeabilidad no sean suficientes para comprometer el crecimiento bacteriano, podrían estar potenciando el efecto de la colistina.

DISCUSIÓN GENERAL

Las cepas de *A. baumannii* (CR17) y *K. pneumoniae* (Kp21) resistentes a colistina presentaron mutaciones en *pmrA* y *mgrB*, respectivamente (392). *pmrA* forma parte del sistema de dos componentes PmrA/PmrB que, al ser mutado, puede originar cambios en las cargas netas del LPS y reducir la carga negativa de la superficie bacteriana (441). Por otro lado, *mgrB* es un regulador negativo del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ y su mutación ha sido descrita principalmente en cepas clínicas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas tipo KPC como la utilizada en este estudio (442). Mutaciones en *mgrB* también modifican la carga neta del LPS (443). Estudios previos utilizando la medición del potencial Z, muestran que cepas de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* resistentes a colistina presentan una menor carga negativa en la superficie bacteriana (444-446). Igual que en el caso de la niclosamida (392), la incubación de cepas de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina con rafoxanida produjo un aumento de la carga negativa de la superficie de membrana respecto a las cepas sin tratar. Este efecto fue mayor en las cepas resistentes a colistina debido a que éstas presentaban menos cargas negativas superficiales que las cepas sensibles a colistina (Figura 3B, Artículo 3, Capítulo II). Debido a que la colistina es un péptido catiónico que interacciona con las fracciones cargadas negativamente del lípido A del LPS conduciendo a su permeabilización (447), el aumento en las cargas positivas de esta estructura produce una disminución de la sensibilidad a este antibiótico. Sin embargo, el aumento de cargas negativas gracias a la acción de la rafoxanida, aumenta de nuevo la afinidad de la colistina por el LPS restaurando su actividad. Por lo tanto, el mecanismo por el cual la rafoxanida restituye la actividad de la colistina consiste en un aumento de permeabilidad y de cargas negativas en la superficie bacteriana potenciando la actividad de este antibiótico. Por el contrario, la incubación con rafoxanida no produjo cambios en el perfil de las OMPs en ninguna de las cepas de estudio (Figura S2, Artículo 3, Capítulo II). Resultados similares se obtuvieron después de la incubación con oxiclozanida (393). Además, tampoco se vio modificada la liberación de ROS, indicando que no forma parte del mecanismo de acción de la rafoxanida (Figura S3, Artículo 3, Capítulo II). La actividad sinérgica de otros antimicrobianos con acción sobre la pared bacteriana de bacterias grampositivas y gramnegativas como vancomicina, imipenem o piperacilina/tazobactam en combinación con rafoxanida fue testada en nuestro estudio (Tabla S1, Artículo 3, Capítulo II). A pesar de actuar sobre la membrana bacteriana, ninguno de estos antibióticos presentó sinérgica con rafoxanida. Sin embargo, la permeabilización de *P. aeruginosa* por parte de la oxiclozanida,

DISCUSIÓN GENERAL

incrementa la acumulación de la tobramicina en el interior celular mejorando su efecto (394). Este estudio nos indica que otros antibióticos con diferentes dianas terapéuticas podrían presentar sinergia con rafoxanida.

Después de los resultados obtenidos *in vitro*, se estudió la eficacia terapéutica de la rafoxanida en un modelo de sepsis peritoneal murino por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* resistentes a colistina. El tratamiento combinado de colistimetato de sodio (CMS) y rafoxanida presentó eficacia en todas las cepas, reduciendo el contaje bacteriano en sangre y tejidos y aumentando la supervivencia animal entre el 53% y el 73%. Inesperadamente, la monoterapia con rafoxanida presentó resultados similares a los obtenidos en combinación mientras que, como era de esperar, la monoterapia con CMS no presentó eficacia terapéutica al tratarse de cepas resistentes a colistina (Tabla 2, Figura 4, Artículo 3, Capítulo II). Igual que para el tamoxifeno, se usaron ratones inmunodeprimidos mediante el tratamiento con ciclofosfamida para evaluar la contribución del sistema inmune en respuesta a la monoterapia con rafoxanida. Los resultados obtenidos indicaron que parte de la eficacia terapéutica del fármaco está determinada por la acción del mismo en el sistema inmune del huésped (Tabla 3, Artículo 3, Capítulo II). El papel de la rafoxanida sobre las células del sistema inmune y en vías de señalización implicadas en la inflamación es totalmente desconocido. Varios estudios ponen de manifiesto que la niclosamida interviene en un gran número de vías de señalización y procesos biológicos en modelos de enfermedad (384). La niclosamida reduce la producción de citoquinas y quimioquinas por parte células dendríticas derivadas de la médula ósea en respuesta a la estimulación con LPS y atenúa la activación de las MAPK y la vía de NF- κ B, estrechamente relacionadas con la inflamación (448). Otro estudio muestra de nuevo que la niclosamida inhibe NF- κ B en células de leucemia mielógena aguda (449). Es posible que la rafoxanida, al ser una molécula análoga, también atenúe su expresión. Las proteínas de la vía de NF- κ B son activadas rápidamente por señales intracelulares o extracelulares en las que se incluyen los PAMPs. Una vez activadas, regulan la transcripción de una gran variedad de genes como genes asociados a la respuesta innata y adaptativa del huésped y un amplio espectro de genes anti-microbianos y pro-inflamatorios con la finalidad de eliminar el patógeno (450). Sin embargo, en el caso de la sepsis, la inhibición de la activación de NF- κ B previene el daño multiorgánico y mejora la supervivencia en modelos murinos de shock séptico (451). Por lo tanto, sería interesante estudiar esta vía de señalización en respuesta a la rafoxanida y su contribución en un modelo murino de sepsis peritoneal

DISCUSIÓN GENERAL

por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* para acabar de conocer su mecanismo de acción *in vivo*.

Sin embargo, igual que en otros miembros de la misma familia, es posible que la actividad de la rafoxanida no sólo se limite a su acción frente al huésped sino que también esté inhibiendo mecanismos bacterianos como factores de virulencia que no afecten al crecimiento de las cepas de estudio *in vitro* pero sí que tengan repercusión en un modelo *in vivo* de infección. Diferentes estudios muestran que la niclosamida y sus derivados inhiben el *quorum sensing* de *P. aeruginosa* e inhiben toxinas de *C. difficile*, respectivamente (389,390). Como se ha comentado anteriormente, la inhibición de estos factores de virulencia no inhibe el crecimiento *in vitro* pero conlleva un aumento de la supervivencia en modelos de *Galleria mellonella* y modelos murinos.

Una de las desventajas que suponen los antihelmínticos para el tratamiento de infecciones sistémicas, es la poca absorción que presentan cuando el tratamiento se administra por vía oral (452). Dentro de los miembros de esta familia, la rafoxanida presentó mejores valores farmacocinéticos en términos de concentración máxima, absorción y biodisponibilidad (453). Sin embargo, estudios utilizando otras vías de administración para los antihelmínticos son necesarios debido a la falta de ensayos clínicos.

En resumen, esta tesis doctoral propone dos nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de sepsis causadas por *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae*. Pese a las diferencias descritas en su mecanismo de acción y su indicación inicial, ambos fármacos en monoterapia modifican la respuesta inmune del huésped en un modelo de sepsis peritoneal murino. Además, ambos presentan sinergia con colistina *in vitro*, por lo que sería posible usarlos como tratamiento adyuvante. Sin embargo, cabe la posibilidad de que, tal y como sucede con la dosis utilizada de rafoxanida en este estudio, la monoterapia con tamoxifeno también alcance su máximo efecto impidiendo potenciar el efecto de la colistina.

A pesar de que tanto el tamoxifeno como la rafoxanida actúan a nivel de células de la inmunidad innata, como se ha mostrado con la utilización de ratones tratados con ciclofosfamida, su mecanismo de acción es diferente. En esta tesis doctoral, hemos visto que el tamoxifeno modifica la migración de células de origen mielóide, monocitos y neutrófilos desde la médula ósea hasta la sangre. Estudios similares se realizaron en

DISCUSIÓN GENERAL

ratones tratados con rafoxanida, sin observar diferencias entre los grupos infectados e infectados y tratados (datos no mostrados).

Otra de las diferencias radica en que el tamoxifeno podría usarse como terapia preventiva mientras que la rafoxanida se ha estudiado como terapia directa. Además, el tratamiento con tamoxifeno, aunque en menor medida, continúa presentando eficacia en ratones inmunodeprimidos. Por ello, la rafoxanida estaría indicada para infecciones de carácter más agudo en pacientes que no se encuentren inmunodeprimidos y por otro lado el tamoxifeno, sería más indicado como tratamiento profiláctico en pacientes hospitalizados con riesgo de desarrollar sepsis por BGN, pudiendo incluir aquellos que se encuentren en un estado de inmunodepresión.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Capítulo I. Reposicionamiento del tamoxifeno como estrategia antimicrobiana.

1. La infección causada por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* aumenta la migración de las células del sistema inmune innato, incluyendo células de origen mieloide, monocitos pro-inflamatorios y neutrófilos, desde la médula ósea hasta el torrente sanguíneo.
2. La migración de las células del sistema inmune en respuesta a la infección por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* es debida, en gran medida, al aumento de los niveles de MCP-1 y la implicación de su vía de señalización constituida por IL-18 y ERK.
3. El tratamiento con tamoxifeno reduce los niveles de MCP-1 a través de la reducción de IL-18 y la forma fosforilada activa de ERK.
4. El tratamiento con tamoxifeno reduce la migración de las células del sistema inmune innato, incluyendo células de origen mieloide, monocitos pro-inflamatorios y neutrófilos, desde la médula ósea hasta el torrente sanguíneo.
5. La incubación con tamoxifeno aumenta la actividad bactericida de macrófagos y neutrófilos *in vitro*.
6. El tratamiento con tamoxifeno presenta eficacia *in vivo* en los modelos de sepsis peritoneal en ratones inmunocompetentes causada por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.
7. El tratamiento con tamoxifeno presenta eficacia *in vivo* en los modelos de sepsis peritoneal en ratones inmunodeprimidos causada por *A. baumannii* y *E. coli*.
8. Los metabolitos del tamoxifeno presentan actividad conjunta *in vitro* frente a cepas de referencia y aislados clínicos de *A. baumannii* y *E. coli*.

Capítulo II. Reposicionamiento de la rafoxanida como terapia antimicrobiana

9. La rafoxanida presenta actividad sinérgica *in vitro* en combinación con colistina frente a cepas de referencia sensibles y cepas clínicas resistentes a colistina de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.

CONCLUSIONES

- 10.** La rafoxanida provoca una disrupción de la membrana de la célula bacteriana, y aumenta su permeabilidad y su carga negativa neta, mecanismos por los cuales se produce la sinergia con colistina.
- 11.** La rafoxanida no afecta al perfil de proteínas de la membrana externa de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina ni a la liberación de especies reactivas de oxígeno por parte de cepas resistentes a colistina de los tres patógenos.
- 12.** El tratamiento con rafoxanida en monoterapia y en terapia combinada con colistina presenta eficacia en el modelo de sepsis peritoneal en ratones inmunocompetentes causada por cepas resistentes a colistina de los tres patógenos.
- 13.** La monoterapia con rafoxanida no presenta eficacia terapéutica en el modelo de sepsis peritoneal en ratones inmunodeprimidos causada por cepas resistentes a colistina de los tres patógenos.
- 14.** La actividad *in vivo* de la rafoxanida requiere de la respuesta inmune del huésped.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Taneja N, Sethi S, Ajay, Tahlan AK, Kumar Y. Introductory chapter: Stepping into the post-antibiotic era-challenges and solutions. Antimicrobial resistance. Global health threat. 2019.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic resistance threats report. 2019.
3. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, Colomb-Cotinat M, Kretzschmar ME, Devleeschauwer B, Cecchini M, Ouakrim DA, Oliveira TC, Struelens MJ, Suetens C, Monnet DL. Burden of AMR Collaborative Group. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2019; 19(1):56-66.
4. World health organization (WHO). No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections. Report to the secretary-general of the united nations. Interagency Coordinaton Group on antimicrobial resistance (IACG). April 2019.
5. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, Nisar MA, Alvi RF, Aslam MA, Qamar MU, Salamat MKF, Baloch Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018; 10;11:1645-1658.
6. World health organization (WHO). Antimicrobial resistance (WHO Fact sheets). Publised in February 2018.
7. World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. WHOint. 2014.
8. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report. Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infections. 2014.
9. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Report. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018.
10. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outtersson K, Patel J, Cavaleri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N, WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18(3):318-327.

BIBLIOGRAFÍA

11. Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, Pant S, Gandra S, Levin SA, Goossens H, Laxminarayan R. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115(15):E3463-E3470.
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA. Annual epidemiological report for 2018.
13. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption database (ESAC-Net). Consumption of antibacterials for systemic use (ATC group J01) in the community and hospital sector in Europe, reporting year 2018.
14. O' Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. Review on Antimicrobial resistance. 2016.
15. World Health Organization. WHO Report on surveillance of antibiotic consumption. 2016-2018. Early implementation.
16. Peñalva G, Fernández-Urrusuno R, Turmo JM, Hernández-Soto R, Pajares I, Carrión L, Vázquez-Cruz I, Botello B, García-Robredo B, Cámara-Mestres M, Domínguez-Camacho JC, Aguilar-Carnerero MM, Lepe JA, de Cueto M, Serrano-Martino MC, Domínguez-Jiménez MC, Domínguez-Castaño A, Cisneros JM, PIRASOA-FIS team. Long-term impact of an educational antimicrobial stewardship programme in primary care on infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in the community: an interrupted time-series analysis. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20(2):199-207.
17. Cisneros JM, Neth O, Gil-Navarro MV, Lepe JA, Jiménez-Parrilla F, Cordero E, Rodríguez-Hernández MJ, Amaya-Villar R, Cano J, Gutiérrez-Pizarraya A, García-Cabrera E, Molina J, PRIOAM team. Global impact of an educational antimicrobial stewardship programme on prescribing practice in a tertiary hospital centre. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(1):82-88.
18. CDC/NHSN Surveillance Definition of Healthcare-Associated Infection and Criteria for Specific Types of Infections. 2013.
19. Hsu V. Prevention of Healthcare-Associated Infections. *American Family Physician*. 2014; 90:377-382.
20. European Centre for Disease Prevention and Control. Infographic: Healthcare-associated infections - a threat to patient safety in Europe. 2018.
21. Haque M, Sartelli M, McKimm J, Abu Bakar M. Health care-associated infections - an overview. *Infect Drug Resist*. 2018; 11:2321-2333.

BIBLIOGRAFÍA

22. Fernando SA, Gray TJ, Gottlieb T. Healthcare-acquired infections: prevention strategies. *Intern Med J.* 2017; 47(12):1341-1351.
23. Al-Tawfiq JA, Tambyah PA. Healthcare associated infections (HAI) perspectives. *J Infect Public Health.* 2014; 7(4):339-344.
24. European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections in intensive care units-Annual Epidemiological Report for 2017.
25. European Centre for Disease Prevention and Control. Incidence and attributable mortality of healthcare-associated infections in intensive care units in Europe, 2008-2012. Surveillance report.
26. Roberts RR, Scott RD 2nd, Hota B, Kampe LM, Abbasi F, Schabowski S, Ahmad I, Ciavarella GG, Cordell R, Solomon SL, Hagtvedt R, Weinstein RA. Costs attributable to healthcare-acquired infection in hospitalized adults and a comparison of economic methods. *Med Care.* 2010; 48:1026-1035.
27. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 2010; 362:1804-1813.
28. Gastmeier P, Schwab F, Sohr D, Behnke M, Geffers C. Reproducibility of the surveillance effect to decrease nosocomial infection rates. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009; 30(10):993-999.
29. Haley RW, Culver DH, White JW, Morgan WM, Emori TG, Munn VP, Hooton TM. The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in US hospitals. *Am J Epidemiol.* 1985; 121:182-205.
30. Gaynes R, Edwards JR, National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(6):848-854.
31. Mehrad B, Clark NM, Zhanel GG, Lynch JP 3rd. Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. *Chest.* 2015; 147:1413-1421.
32. Maravić A, Skočibušić M, Fredotović Ž, Šamanić I, Cvjetan S, Knezović M, Puizina J. Urban riverine environment is a source of multidrug-resistant and ESBL-producing clinically important *Acinetobacter* spp. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016; 23(4): 3525-3535.
33. Lin MF and Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from bench to bedside. *World J Clin Cases.* 2014; 2:787-814.

BIBLIOGRAFÍA

34. Dexter C, Murray GL, Paulsen IT, Peleg AY. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015; 13(5):567-573.
35. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC, Lee SH. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 13;7:55.
36. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K; EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009; 302:2323-2329.
37. Garnacho-Montero J, Timsit J. Managing *Acinetobacter baumannii* infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2019; 32(1):69-76.
38. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(3):538-582.
39. European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in healthcare settings. Rapid Risk assessment. 2016.
40. Chung DR, Song JH, Kim SH, Thamlikitkul V, Huang SG, Wang H, So TM, Yasin RM, Hsueh PR, Carlos CC, Hsu LY, Buntaran L, Lalitha MK, Kim MJ, Choi JY, Kim SI, Ko KS, Kang CI, Peck KR, Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens Study Group. High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 184(12):1409-1417.
41. Ma YX, Wang CY, Li YY, Li J, Wan QQ, Chen JH, Tay FR, Niu LN. Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. *Adv Sci*. 2019; 5;7(1):1901872.
42. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Report. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. 2016.
43. Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Genet Evol*. 2013; 16:38-53.
44. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 41(1):11-19.

BIBLIOGRAFÍA

45. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PLoS One. 2010; 5(4):e10034.
46. Villalón P, Valdezate S, Cabezas T, Ortega M, Garrido N, Vindel A, Medina-Pascual MJ, Saez-Nieto JA. Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital. BMC Microbiol. 2015; 15:47.
47. Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. J Clin Microbiol. 2011; 49(3):875-882.
48. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009; 48:1-12.
49. Pogue JM, Mann T, Barber KE, Kaye KS. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, surveillance and management. Expert Rev Anti-infective Ther. 2013; 4:383-393.
50. Touchon M, Cury J, Yoon EJ, Krizova L, Cerqueira GC, Murphy C, Feldgarden M, Wortman J, Clermont D, Lambert T, Grillot-Courvalin C, Nemec A, Courvalin P, Rocha EP. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. Genome Biol. Evol. 2014; 6:2866-2882.
51. Atasoy AR, Ciftci IH, Petek M. Modifying enzymes related aminoglycoside: analyses of resistant *Acinetobacter* isolates. Int J Clin Exp Med. 2015; 8(2):2874-2880.
52. Nemec A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. J Med Microbiol. 2004; 53(Pt 12):1233-1240.
53. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2007; 59(6):1210-1215.
54. Abdi SN, Ghotaslou R, Ganbarov K, Mobed A, Tanomand A, Yousefi M, Asgharzadeh M, Kafil H. *Acinetobacter baumannii* efflux pumps and antibiotic resistance. Infect Drug Resist. 2020; 13:423-434.

BIBLIOGRAFÍA

55. Xu C, Bilya SR, Xu W. *adeABC* efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbes New Infect.* 2019; 30:100549.
56. Yan N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem Sci.* 2013; 38(3):151-159.
57. Martí S, Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Rodríguez-Baño J, Bou G, Cisneros JM, Pachón J, Martínez-Martínez L, Vila J. Prevalencia de los genes *tetA* y *tetB* como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 24(2):77-80.
58. Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya, T. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:4362-4364.
59. Srinivasan VB, Rajamohan, G and Gebreyes WA. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:5312–5316.
60. Pérez-Varela M, Corral J, Aranda J, Barbé J. Roles of efflux pumps from different superfamilies in the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63(3):e02190-18.
61. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie JM. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2006; 2(1):e7.
62. Catel-Ferreira M, Coadou G, Molle V, Mugnier P, Nordmann P, Siroy A, Jouenne T, Dé E. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(9):2053-2056.
63. Dupont M, Pages J M, Lafitte D, Siroy A and Bollet C. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res.* 2005; 4:2386-2390.
64. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(9):3299-3305.

BIBLIOGRAFÍA

65. Tomás M, Beceiro A, Pérez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R, Martínez-Beltrán J, Bou G. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(12):5172-5175.
66. Parra-Millán R, Vila-Farrés X, Ayerbe-Algaba R, Varese M, Sánchez-Encinales V, Bayó N, Pachón-Ibáñez ME, Teixidó M, Vila J, Pachón J, Giralt E, Smani Y. Synergistic activity of an OmpA inhibitor and colistin against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanistic analysis and *in vivo* efficacy. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73(12):3405-3412.
67. Smani Y, Fabrega A, Roca I, Sanchez-Encinales V, Vila J and Pachon J. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58:1806-1808.
68. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Marcos A, Jimenez de Anta T. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39(5):1201-1203.
69. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jimenez de Anta T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 1997; 39(6):757-762.
70. Ribera A, Ruiz J and Vila J. Presence of the TetM determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(7):2310-2312.
71. He T, Wang R, Liu D, Walsh TR, Zhang R, Lv Y, Ke Y, Ji Q, Wei R, Liu Z, Shen Y, Wang G, Sun L, Lei L, Lv Z, Li Y, Pang M, Wang L, Sun Q, Fu Y, Song H, Hao Y, Shen Z, Wang S, Chen G, Wu C, Shen J, Wang Y. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. *Nat Microbiol.* 2019; 4(9):1450-1456.
72. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, Dhanji H, Chart H, Bou G, Livermore DM, Woodford N. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the *pmrAB* two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(7):3370-3379.
73. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, Henry R, Crane B, St Michael F, Cox AD, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. Colistin

BIBLIOGRAFÍA

- resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(12):4971-4977.
74. Carretero-Ledesma M, García-Quintanilla M, Martín-Peña R, Pulido MR, Pachón J, McConnell MJ. Phenotypic changes associated with colistin resistance due to lipopolysaccharide loss in *Acinetobacter baumannii*. *Virulence.* 2018; 9(1):930-942.
 75. Martins-Sorenson N, Snesrud E, Xavier DE, Cacci LC, Iavarone AT, McGann P, Riley LW, Moreira BM. A novel plasmid-encoded mcr-4.3 gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 75(1):60-64.
 76. Kanafani ZA. *Acinetobacter* infection: Treatment and prevention. UpToDate, 2018.
 77. Nation RL, Velkov T, Li J. Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese? *Clin Infect Dis.* 2014; 59(1):88-94.
 78. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6(9):589-601.
 79. LaPlante K, Cusumano J, Tillotson G. Colistin for the treatment of multidrug resistant infections. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18:1174e5.
 80. Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE, Papadomichelakis E, Antoniadou A, Tsangaris I, et al. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 8:3430e6.
 81. Pogue JM, Lee J, Marchaim D, Yee V, Zhao JJ, Chopra T, Lephart P, Kaye KS. Incidence of and risk factors for colistin-associated nephrotoxicity in a large academic health system. *Clin Infect Dis.* 2011; 53(9):879-884.
 82. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(1):351-352.
 83. Piperaki ET, Tzouveleki LS, Miriagou V, Daikos GL. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: in pursuit of an effective treatment. *Clin Microbiol Infect.* 2019; 25(8):951-957.

BIBLIOGRAFÍA

84. Kalin G, Alp E, Akin A, Coskun R, Doganay M. Comparison of colistin and colistin/sulbactam for the treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *Infection*. 2014; 42(1):37-42.
85. Park HJ, Cho JH, Kim HJ, Han SH, Jeong SH, Byun MK. Colistin monotherapy versus colistin/rifampicin combination therapy in pneumonia caused by colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: A randomised controlled trial. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019; 17:66-71.
86. Paul M, Daikos GL, Durante-Mangoni E, Yahav D, Carmeli Y, Benattar YD, Skiada A, Andini R, Eliakim-Raz N, Nutman A, Zusman O, Antoniadou A, Pafundi PC, Adler A, Dickstein Y, Pavleas I, Zampino R, Daitch V, Bitterman R, Zayyad H, Koppel F, Levi I, Babich T, Friberg LE, Mouton JW, Theuretzbacher U, Leibovici L. Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18(4):391-400.
87. Ni W, Han Y, Zhao J, Wei C, Cui J, Wang R, Liu Y. Tigecycline treatment experience against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2016; 47(2):107-116.
88. Kengkla K, Kongpakwattana K, Saokaew S, Apisarnthanarak A, Chaiyakunapruk N. Comparative efficacy and safety of treatment options for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and network meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73(1):22-32.
89. Barbour A, Schmidt S, Ma B, Schiefelbein L, Rand KH, Burkhardt O, Derendorf H. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tigecycline. *Clin Pharmacokinet*. 2009; 48(9):575-584.
90. De Pascale G, Montini L, Pennisi M, Bernini V, Maviglia R, Bello G, Spanu T, Tumbarello M, Antonelli M. High dose tigecycline in critically ill patients with severe infections due to multidrug-resistant bacteria. *Crit Care*. 2014; 18(3):R90.
91. Viehman JA, Nguyen MH, Doi Y. Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Drugs*. 2014; 74(12):1315-1333.
92. Betrosian AP, Frantzeskaki F, Xanthaki A, Douzinas EE. Efficacy and safety of high-dose ampicillin/sulbactam vs. colistin as monotherapy for the treatment of

BIBLIOGRAFÍA

- multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *J Infect.* 2008; 56(6):432-436.
93. Oliveira MS, Prado GV, Costa SF, Grinbaum RS, Levin AS. Ampicillin/sulbactam compared with polymyxins for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(6):1369-1375.
94. Fernández-Cuenca F, Tomás-Carmona M, Caballero-Moyano F, Bou G, Martínez-Martínez L, Vila J, Pachón J, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pascual A; grupo del proyecto GEIH-REIPI-Ab 2010. *In vitro* activity of 18 antimicrobial agents against clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: multicenter national study GEIH-REIPI-Ab 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31(1):4-9.
95. Castanheira M, Mendes RE, Jones RN. Update on *Acinetobacter* species: mechanisms of antimicrobial resistance and contemporary *in vitro* activity of minocycline and other treatment options. *Clin Infect Dis.* 2014; 59 Suppl 6:S367-S373.
96. Fragkou PC, Poulakou G, Blizou A, Blizou M, Rapti V, Karageorgopoulos DE, Koulenti D, Papadopoulos A, Matthaiou DK, Tsiodras S. The role of minocycline in the treatment of nosocomial infections caused by multidrug, extensively drug and pandrug resistant *Acinetobacter baumannii*: A systematic review of clinical evidence. *Microorganisms.* 2019; 7(6). pii: E159.
97. Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Principles and practices of infectious diseases. Mandell GI BJ, Dolin R (Eds). Churchill Livingstone, PA, USA, 2310-2335. 2000.
98. ALfadli M, El-Sehsah EM, Ramadan MA. Risk factors and distribution of MDROs among patients with healthcare associated burn wound infection. *Germs.* 2018; 8(4):199-206.
99. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, Deschaght P, Vanechoutte M, Jennes S, Pitt T, De Vos D. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One.* 2009; 14(11):e7740.
100. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 2015; 22:41-59.
101. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, Benito N, Grau S. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively

BIBLIOGRAFÍA

- drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. Clin Microbiol Rev. 2019; 28;32(4):e00031-19.
102. Nikaido H, Nikaido K, Harayama S. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem. 1991; 266(2):770-779.
 103. Sugawara E, Nestorovich EM, Bezrukov SM, Nikaido H. *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. J Biol Chem. 2006; 281(24):16220-16229.
 104. Yoneyama H, Yamano Y, Nakae T. Role of porins in the antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: construction of mutants with deletions in the multiple porin genes. Biochem Biophys Res Commun. 1995; 213(1):88-95.
 105. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. Int J Med Microbiol. 2012; 302(2):63-68.
 106. Richardot C, Plésiat P, Fournier D, Monlezun L, Broutin I, Llanes C. Carbapenem resistance in cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa* as a result of amino acid substitutions in porin OprD. Int J Antimicrob Agents. 2015; 45(5):529-532.
 107. Huang H, Hancock RE. The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem-specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 1996; 178:3085-3090.
 108. Yoon EJ, Kim D, Lee H, Lee HS, Shin JH, Park YS, Kim YA, Shin JH, Shin KS, Uh Y, Jeong SH. Mortality dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections and the influence of defective OprD on mortality: prospective observational study. J Antimicrob Chemother. 2019; 74(9):2774-2783.
 109. Macfarlane EL, Kwasnicka A, Ochs MM, Hancock RE. PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. Mol Microbiol. 1999; 34(2):305-316.
 110. Young ML, Bains M, Bell A, Hancock RE. Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36(11):2566-2568.
 111. Avrain L., Mertens P and Van Bambeke, F. RND efflux pumps in *P. aeruginosa*: an underestimated resistance mechanism. Antibiot Susceptibility. 2013; 26321:26-28.

BIBLIOGRAFÍA

112. Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. Extrusion of penem antibiotics by multicomponent efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(8):2696-2699.
113. Llanes C, Köhler T, Patry I, Dehecq B, van Delden C, Plésiat P. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(12):5676-5684.
114. López-Causapé C, Cabot G, Del Barrio-Tofiño E, Oliver A. The versatile mutational resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2018; 9:685.
115. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 2010; 13(6):151-171.
116. Davies J and Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010; 74(3):417-433.
117. Lee JY, Park YK, Chung ES, Na IY, Ko KS. Evolved resistance to colistin and its loss due to genetic reversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.* 2016; 6:25543.
118. Kao CY, Chen SS, Hung KH, Wu HM, Hsueh PR, Yan JJ, Wu JJ. Overproduction of active efflux pump and variations of OprD dominate in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bloodstream infections in Taiwan. *BMC Microbiol.* 2016; 16(1):107.
119. Braz VS, Furlan JP, Fernandes AF, Stehling EG. Mutations in NalC induce MexAB-OprM overexpression resulting in high level of aztreonam resistance in environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 2016; 363(16). pii: fnw166.
120. Hocquet D, Nordmann P, El Garch F, Cabanne L, Plésiat P. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(4):1347-1351.
121. Juan C, Maciá MD, Gutiérrez O, Vidal C, Pérez JL, Oliver A. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(11):4733-4738.
122. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol.* 2011; 2:65.

BIBLIOGRAFÍA

123. Moyá B, Beceiro A, Cabot G, Juan C, Zamorano L, Alberti S, Oliver A. Pan- β -lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(9):4771-4778.
124. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, Høiby N, Moskowitz SM. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(12):5761-5769.
125. Sandoval-Motta S and Aldana M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016; 8(3):253-267.
126. Mehta HH, Prater AG, Beabout K, Elworth RAL, Karavis M, Gibbons HS, Shamoo Y. The essential role of hypermutation in rapid adaptation to antibiotic stress. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63(7): e00744-19.
127. Fernández L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock RE. Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(8):3372-3382.
128. Drenkard E and Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature.* 2002; 416(6882):740-743.
129. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7:39.
130. Mensa J, Barberán J, Soriano A, Llinares P, Marco F, Cantón R, Bou G, González Del Castillo J, Maseda E, Azanza JR, Pasquau J, García-Vidal C, Reguera JM, Sousa D, Gómez J, Montejo M, Borges M, Torres A, Alvarez-Lerma F, Salavert M, Zaragoza R, Oliver A. Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. *Rev Esp Quimioter.* 2018; 31(1):78-100.
131. Cantón R, Máiz L, Escribano A, Oliveira C, Oliver A, Asensio O, Gartner S, Roma E, Quintana-Gallego E, Salcedo A, Girón R, Barrio MI, Pastor MD, Prados C, Martínez-Martínez MT, Barberán J, Castón JJ, Martínez-Martínez L, Poveda JL, Vázquez C, de Gracia J, Solé A. Spanish consensus on the prevention and

BIBLIOGRAFÍA

- treatment of *Pseudomonas aeruginosa* bronchial infections in cystic fibrosis patients. Arch Bronconeumol. 2015; 51(3):140-150.
132. Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, Mouton JW, Paterson DL, Tam VH, Theuretzbacher U, Tsuji BT, Turnidge JD. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. Lancet Infect Dis. 2015; 15(2):225-234.
133. Garonzik SM, Li J, Thamlikitkul V, Paterson DL, Shoham S, Jacob J, Silveira FP, Forrest A, Nation RL. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(7):3284-3294.
134. Couet W, Grégoire N, Marchand S, Mimos O. Colistin pharmacokinetics: the fog is lifting. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(1):30-39.
135. Khawcharoenporn T, Chuncharunee A, Maluangnon C, Taweesakulvashra T, Tiamsak P. Active monotherapy and combination therapy for extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Int J Antimicrob Agents. 2018; 52(6):828-834.
136. Ribera A, Benavent E, Lora-Tamayo J, Tubau F, Pedrero S, Cabo X, Ariza J, Murillo O. Osteoarticular infection caused by MDR *Pseudomonas aeruginosa*: the benefits of combination therapy with colistin plus β -lactams. J Antimicrob Chemother. 2015; 70(12):3357-3365.
137. Tsuji BT, Pogue JM, Zavascki AP, Paul M, Daikos GL, Forrest A, Giacobbe DR, Viscoli C, Giamarellou H, Karaiskos I, Kaye D, Mouton JW, Tam VH, Thamlikitkul V, Wunderink RG, Li J, Nation RL, Kaye KS. International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). Pharmacotherapy. 2019; 39(1):10-39.
138. Falagas ME, Kastoris AC, Karageorgopoulos DE, Rafailidis PI. Fosfomycin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34(2):111-120.

BIBLIOGRAFÍA

139. Escolà-Vergé L, Pigrau C, Los-Arcos I, Arévalo Á, Viñado B, Company D, Larrosa N, Nuvials X, Ferrer R, Len O, Almirante B. Ceftolozane/tazobactam for the treatment of XDR *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Infection*. 2018; 46(4):461-468.
140. Zasowski EJ, Rybak JM, Rybak MJ. The β -Lactams strike back: ceftazidime-avibactam. *Pharmacotherapy*. 2015; 35(8):755-770.
141. Abboud MI, Damblon C, Brem J, Smargiasso N, Mercuri P, Gilbert B, Rydzik AM, Claridge TD, Schofield CJ, Frère JM. Interaction of avibactam with Class B Metallo- β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 23;60(10):5655-5662.
142. Sy SK, Zhuang L, Beaudoin ME, Kircher P, Tabosa MA, Cavalcanti NC, Grunwitz C, Pieper S, Schuck VJ, Nichols WW, Derendorf H. Potentiation of ceftazidime by avibactam against β -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* infection model. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72(4):1109-1117.
143. Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Zhanel M, Lagacé-Wiens PRS, Walkty A, Denisuik A, Golden A, Gin AS, Hoban DJ, Lynch JP 3rd, Karlowsky JA. Imipenem-relebactam and meropenem-vaborbactam: Two novel carbapenem- β -Lactamase inhibitor combinations. *Drugs*. 2018; 78(1):65-98.
144. Karlowsky JA, Lob SH, Young K, Motyl MR, Sahm DF. Activity of imipenem/relebactam against *Pseudomonas aeruginosa* with antimicrobial-resistant phenotypes from seven global regions: SMART 2015-2016. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018; 15:140-147.
145. Karlowsky JA, Lob SH, Young K, Motyl MR, Sahm DF. Activity of imipenem-relebactam against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from the United States - SMART 2015-2017. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019; 95(2):212-215.
146. Lob SH, Karlowsky JA, Young K, Motyl MR, Hawser S, Kothari ND, Gueny ME, Sahm DF. Activity of imipenem/relebactam against MDR *Pseudomonas aeruginosa* in Europe: SMART 2015-17. *J Antimicrob Chemother*. 2019; 74(8):2284-2288.
147. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, S Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov.,

BIBLIOGRAFÍA

- Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov.
148. Strockbine N, Bopp C, Fields, Kaper J, Nataro J. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: Manual of Clinical Microbiology. ASM Press (Ed). USA, 685-712. 2015.
 149. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. Future Microbiol. 2014; 9(9):1071-1081.
 150. Brenner D, Farmer J, Family I. *Enterobacteriaceae*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer (Ed). New York, USA, 587-607. 2005.
 151. Bagley ST. Habitat association of *Klebsiella* species. Infect Control IC. 1985; 6:52-8.
 152. Rock C, Thom KA, Masnick M, Johnson JK, Harris AD, Morgan DJ. Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing *Klebsiella* species contamination of healthcare workers and the environment. Infect Control Hosp Epidemiol. 2014; 35:426-429.
 153. 154 Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11:142-201.
 154. Manges AR, Geum HM, Guo A, Edens TJ, Fibke CD, Pitout JDD. Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. Clin Microbiol Rev. 2019; 32:e00135-18.
 155. Dale AP, Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. J Infect. 2015; 71:615-626.
 156. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8:4.
 157. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report for 2016. Healthcare-associated infections: surgical site infections. 2018.
 158. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Estudio EPINE-EPPS 2018. Informe global de España. 2018.
 159. European Centre for Disease Prevention and Control. Pasmid mediated colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. Rapid risk assessment. 2016.
 160. Banerjee R, Johnston B, Lohse C, Chattopadhyay S, Tchesnokova V, Sokurenko EV, Johnson JR. The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57:5912-5917.

BIBLIOGRAFÍA

161. Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carbonnelle E, Lortholary O, Clermont O, Denamur D, Picard B, Nassif X, Brisse S. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*. 2008; 9:560.
162. Adams-Sapper S, Diep BA, Perdreau-Remington F, Riley LW. Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and -resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57:490-497.
163. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev*. 2014; 27:543-574.
164. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2016; 80:629-661.
165. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* population genomics and antimicrobial-resistant clones. *Trends Microbiol*. 2016; 24:944-956.
166. Partridge SR. Resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Pathology*. 2015; 47(3):276-284.
167. Fernández-Martínez M, Ruiz Del Castillo B, Lecea-Cuello MJ, Rodríguez-Baño J, Pascual Á, Martínez-Martínez L; Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI) and the Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum β -Lactamases collected in two multicenter studies in Spain. *Microb Drug Resist*. 2018; 24(4):367-376.
168. Nikaido H, Pagès JM. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36(2):340-363.
169. Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, Sørensen SJ. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60(1):145-147.
170. Choi U, Lee CR. Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2019; 10:953.
171. Wong JLC, Romano M, Kerry LE, Kwong HS, Low WW, Brett SJ, Clements A, Beis K, Frankel G. OmpK36-mediated carbapenem resistance attenuates ST258 *Klebsiella pneumoniae* *in vivo*. *Nat Commun*. 2019; 10(1):3957.

BIBLIOGRAFÍA

172. Humphries RM, Hemarajata P. Resistance to ceftazidime-avibactam in *Klebsiella pneumoniae* due to porin mutations and the increased expression of KPC-3. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(6). pii: e00537-17.
173. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall E. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25(5):358-373.
174. Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, de Alba PD, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6^b)-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 39(5):431-434.
175. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents.* 2017; 49(5):526-535.
176. Nang SC, Li J, Velkov T. The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. *Crit Rev Microbiol.* 2019; 45(2):131-161.
177. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, Giske CG, Naas T, Carattoli A, Martínez-Medina M, Bosch J, Retamar P, Rodríguez-Baño J, Baquero F, Soto SM. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev.* 2016; 40(4):437-463.
178. Kalman D, Barriere SL. Review of the pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use of cephalosporins. *Tex Heart Inst J.* 1990; 17:203-215.
179. Wilson WR. The role of fourth-generation cephalosporins in the treatment of serious infectious diseases in hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998; 31:473-477.
180. Hawkey PM, Warren RE, Livermore DM, McNulty CAM, Enoch DA, Otter JA, Wilson APR. Treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria: report of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy/Healthcare Infection Society/British Infection Association Joint Working Party. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73:2-78.
181. Shah PM. Parenteral carbapenems. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:175-180.
182. Hawkey PM and Livermore DM. Carbapenem antibiotics for serious infections. *BMJ.* 2012; 344:e3236.
183. Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect.* 2014; 44:51-56.

BIBLIOGRAFÍA

184. Tehrani KHME, Martin NI. β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations: an update. *Medchemcomm*. 2018; 9(9):1439-1456.
185. Ball P. The clinical development and launch of amoxicillin/clavulanate for the treatment of a range of community-acquired infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 30:113-117.
186. Gin A, Dilay L, Karlowsky JA, Walkty A, Rubinstein E, Zhanel GG. Piperacillin-tazobactam: a beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007; 5(3):365-383.
187. Shirley M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the treatment of serious gram-negative bacterial infections. *Drugs*. 2018; 78(6):675-692.
188. <https://www.fda.gov/drugs/development-resources/imipenem-cilastatin-relebactam-injection>.
189. Zekun Li, Yuping Cao, Lingxian Yi, Jian-Hua Liu, and Qiwen Yang. Emergent polymyxin resistance: end of an era?. *Open Forum Infect Dis*. 2019; 6(10): ofz368.
190. Sastry S, Doi Y. Fosfomycin: resurgence of an old companion. *J Infect Chemother*. 2016; 22(5):273-280.
191. Falagas ME, Vouloumanou EK, Togias AG, Karadima M, Kapaskelis AM, Rafailidis PI, Athanasiou S. Fosfomycin versus other antibiotics for the treatment of cystitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(9):1862-1877.
192. Rosso-Fernández C, Sojo-Dorado J, Barriga A, Lavín-Alconero L, Palacios Z, López-Hernández I, Merino V, Camean M, Pascual A, Rodríguez-Baño J; FOREST Study Group. Fosfomycin versus meropenem in bacteraemic urinary tract infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* (FOREST): study protocol for an investigator-driven randomised controlled trial. *BMJ Open*. 2015; 5(3):e007363.
193. Beceiro A, Tomas M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev*. 2013; 26:185-230.
194. Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13(10):605-619.
195. Smith SG, Mahon V, Lambert MA, Fagan RP. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett*. 2007; 273:1-11.

BIBLIOGRAFÍA

196. Morris FC, Dexter C, Kostoulias X, Uddin MI, Peleg AY. The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2019; 10:1601.
197. Kwon HI, Kim S, Oh MH, Na SH, Kim YJ, Jeon YH, Lee JC. Outer membrane protein A contributes to antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* through the OmpA-like domain. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72(11):3012-3015.
198. Smani Y, Dominguez-Herrera J and Pachon J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J. Infect. Dis.* 2013; 208:1561-1570.
199. Fernández-Cuenca F, Smani Y, Gómez-Sánchez MC, Docobo-Pérez F, Caballero-Moyano FJ, Domínguez-Herrera J, Pascual A, Pachón J. Attenuated virulence of a slow-growing pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is associated with decreased expression of genes encoding the porins CarO and OprD-like. *Int J Antimicrob Agents.* 2011; 38(6):548-549.
200. Fito-Boncompagni L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O, Gicquel G, Bazire A, Madi A, Connil N, Véron W, Taupin L, Toussaint B, Cornelis P, Wei Q, Shioya K, Déziel E, Feuilloley MG, Orange N, Dufour A, Chevalier S. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun.* 2011; 79(3):1176-1186.
201. Meier C., Oelschlaeger T.A., Merkert H., Korhonen T.K., Hacker J. Ability of *Escherichia coli* isolates that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. *Infect Immun.* 1996; 64:2391-2399.
202. Krishnan S, Prasad Rao NV. Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections. *FEBS J.* 2012; 279(6):919-931.
203. Chen JH, Siu LK, Fung CP, Lin JC, Yeh KM, Chen TL, Tsai YK, Chang FY. Contribution of outer membrane protein K36 to antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(5):986-990.
204. Hsieh PF, Liu JY, Pan YJ, Wu MC, Lin TL, Huang YT, Wang JT. *Klebsiella pneumoniae* peptidoglycan-associated lipoprotein and murein lipoprotein contribute to serum resistance, antiphagocytosis, and proinflammatory cytokine stimulation. *J Infect Dis.* 2013; 208(10):1580-1589.

BIBLIOGRAFÍA

205. Flores-Díaz M, Monturiol-Gross L, Naylor C, Alape-Girón A, Flieger A. Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016; 80(3):597-628.
206. Fiester SE, Arivett BA, Schmidt RE, Beckett AC, Ticak T, Carrier MV1 Ghosh R, Ohneck EJ, Metz ML, Sellin Jeffries MK, Actis LA. Iron-regulated phospholipase C activity contributes to the cytolytic activity and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One.* 2016; 11(11):e0167068.
207. Terada LS, Johansen KA, Nowbar S, Vasil AI, Vasil ML. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun.* 1999; 67(5):2371-2376.
208. Lery LM, Frangeul L, Tomas A, Passet V, Almeida AS, Bialek-Davenet S, Barbe V, Bengoechea JA, Sansonetti P, Brisse S, Tournebize R. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. *BMC Biol.* 2014; 12:41.
209. Costa TR, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, Waksman G. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13(6):343-359.
210. Kanonenberg K, Schwarz CK, Schmitt L. Type I secretion systems - a story of appendices. *Res Microbiol.* 2013; 164(6):596-604.
211. Thomas S, Holland IB, Schmitt L. The Type 1 secretion pathway - the hemolysin system and beyond. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1843(8):1629-1641.
212. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol.* 2018; 16(2):91-102.
213. Nivaskumar M, Francetic O. Type II secretion system: a magic beanstalk or a protein escalator. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1843(8):1568-1577.
214. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7(9):654-665.
215. Cornelis GR. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol.* 2006; 4(11):811-825.
216. Grohmann E, Christie PJ, Waksman G, Backert S. Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 2018; 107(4):455-471.
217. Pena RT, Blasco L, Ambroa A, González-Pedrajo B, Fernández-García L, López M, Bleriot I, Bou G, García-Contreras R, Wood TK, Tomás M. Relationship between quorum sensing and secretion systems. *Front Microbiol.* 2019; 10:1100.

BIBLIOGRAFÍA

218. Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe*. 2014; 15(1):9-21.
219. Ramachandran G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. *Virulence*. 2014; 5(1):213-218.
220. Smith YC, Rasmussen SB, Grande KK, Conran RM, O'Brien AD. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. *Infect Immun*. 2008; 76:2978-2990.
221. Dhakal BK, Mulvey MA. The UPEC pore-forming toxin α -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host Microbe*. 2012; 11:58-69.
222. Hertting O, Chromek M, Slamová Z, Kádas L, Söderkvist M, Vainumäe I, Tallvik T, Jacobson S.H., Brauner A. Cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) induces an inflammatory response in the urinary tract *in vitro* but not *in vivo*. *Toxicon*. 2008; 51(8):1544-1547.
223. Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol*. 2019; 17(1):13-24.
224. Anand D, Chaudhuri A. Bacterial outer membrane vesicles: New insights and applications. *Mol Membr Biol*. 2016; 33(6-8):125-137.
225. Tan K, Li R, Huang X, Liu Q. Outer membrane vesicles: current status and future direction of these novel vaccine adjuvants. *Front Microbiol*. 2018; 9:783.
226. Holden VI, Bachman MA. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics: integrated biometal science*. 2015; 7:986-995.
227. Wilson BR, Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y. Siderophores in iron metabolism: from mechanism to therapy potential. *Trends Mol Med*. 2016; 22(12):1077-1090.
228. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology*. 2011; 157:2534-2544.
229. Hahn HP. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*-a review. *Gene*. 1997; 192:99-108.
230. Swiecicki JM, Sliusarenko O, Weibel DB. From swimming to swarming: *Escherichia coli* cell motility in two-dimensions. *Integrative Biology: quantitative biosciences from nano to macro*. 2013; 5:1490-1494.

BIBLIOGRAFÍA

231. Carabarin-Lima A, León-Izurieta L, Rocha-Gracia Rdel C, Castañeda-Lucio M, Torres C, Gutiérrez-Cazarez Z. First evidence of polar flagella in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis. *J Med Microbiol.* 2016; 65:729-737.
232. Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9):634-644.
233. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8:623-633.
234. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005; 13:34-40.
235. González JF, Hahn MM, Gunn JS. Chronic biofilm-based infections: skewing of the immune response. *Pathog Dis.* 2018; 1;76(3):fty023.
236. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41(3):276-301
237. Rendueles O, Ghigo JM. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbours. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36(5):972-989.
238. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* 2010; 5(11):1663-1674.
239. Vallet I, Diggle SP, Stacey RE, Cámara M, Ventre I, Lory S, Lazdunski A, Williams P, Filloux A. Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *J Bacteriol.* 2004; 186(9):2880-2890.
240. Romling U. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62:1234–1246.
241. Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2001; 25:365-404.
242. Camilli A, Bassler BL. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science.* 2006; 311:1113-1116.
243. Saipriya K, Swathi CH, Ratnakar KS, Sritharan V. Quorum-sensing system in *Acinetobacter baumannii*: a potential target for new drug development. *J Appl Microbiol.* 2020; 128(1):15-27.
244. Turkina MV, Vikström E. Bacteria-host crosstalk: Sensing of the quorum in the context of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Innate Immun.* 2019; 11(3):263-279.

BIBLIOGRAFÍA

245. Walters M and Sperandio V. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. Int J Med Microbiol. 2006; 296(2-3):125-131.
246. Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB. AI-2-mediated signalling in bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2013; 37(2):156-181.
247. Wang YM, Dong WL, Odah KA, Kong LC, Ma HX. Transcriptome analysis reveals AI-2 relevant genes of Multi-Drug Resistant *Klebsiella pneumoniae* in response to eugenol at sub-MIC. Front Microbiol. 2019; 10:1159.
248. Smani Y, McConnell MJ, Pachon J. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. PLoS ONE 2012; 7:e33073.
249. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, Sayood K, Iwen PC, Skaar EP, Dunman PM. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. Infect Immun. 2010; 78(5):1952-1962.
250. Liou ML, Soo PC, Ling SR, Kuo HY, Tang CY, Chang KC. The sensor kinase BfmS mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. J Microbiol Immunol Infect. 2014; 47(4):275-281.
251. Iwashkiw JA, Seper A, Weber BS, Scott NE, Vinogradov E, Stratilo C, Reiz B, Cordwell SJ, Whittall R, Schild S, Feldman MF. Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. PLoS Pathog. 2012; 8(6):e1002758.
252. Lin L, Tan B, Pantapalangkoor P, Ho T, Baquir B, Tomaras A, Montgomery JI, Reilly U, Barbacci EG, Hujer K, Bonomo RA, Fernandez L, Hancock RE, Adams MD, French SW, Buslon VS, Spellberg B. Inhibition of LpxC protects mice from resistant *Acinetobacter baumannii* by modulating inflammation and enhancing phagocytosis. mBio 2012; 3(5). pii: e00312-12.
253. Kwon SO, Gho YS, Lee JC, Kim SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. FEMS Microbiol Lett. 2009; 297(2):150-156.
254. Moon DC, Choi CH, Lee JH, Choi CW, Kim HY, Park JS, Kim SI, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. J Microbiol. 2012; 50(1):155-160.
255. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev. 2013; 37(2):130-155.

BIBLIOGRAFÍA

256. Hood MI, Mortensen BL, Moore JL, Zhang Y, Kehl-Fie TE, Sugitani N, Chazin WJ, Caprioli RM, Skaar EP. Identification of an *Acinetobacter baumannii* zinc acquisition system that facilitates resistance to calprotectin-mediated zinc sequestration. *PLoS Pathog.* 2012; 8(12):e1003068.
257. Juttukonda LJ, Chazin WJ, Skaar EP. *Acinetobacter baumannii* coordinates urea metabolism with metal import to resist host-mediated metal limitation. *mBio* 2016; 7(5). pii: e01475-16.
258. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, Orange N, Dufour A, Cornelis P. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41(5):698-722.
259. Vasil ML, Stonehouse MJ, Vasil AI, Wadsworth SJ, Goldfine H, Bolcome RE 3rd, Chan J. A complex extracellular sphingomyelinase of *Pseudomonas aeruginosa* inhibits angiogenesis by selective cytotoxicity to endothelial cells. *PLoS Pathog.* 2009; 5(5):e1000420.
260. Huszczyński SM, Lam JS, Khursigara CM. The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. *Pathogens.* 2019; 9(1): 6.
261. Bomberger JM, Maceachran DP, Coutermarsh BA, Ye S, O'Toole GA, Stanton BA. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog.* 2009; 5(4):e1000382.
262. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GP, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol.* 2010; 300(8):534-543.
263. Schalk IJ, Cunrath O. An overview of the biological metal uptake pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* 2016; 18(10):3227-3246.
264. Li W, Wen L, Li C, Chen R, Ye Z, Zhao J, Pan J. Contribution of the outer membrane protein OmpW in *Escherichia coli* to complement resistance from binding to factor H. *Microb Pathog.* 2016; 98:57-62.
265. Hejair HMA, Zhu Y, Ma J, Zhang Y, Pan Z, Zhang W, Yao H. Functional role of ompF and ompC porins in pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog.* 2017; 107:29-37.
266. Kwan Soo Ko. The contribution of capsule polysaccharide genes to virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Virulence.* 2017; 8(5):485-486.

BIBLIOGRAFÍA

267. Bielaszewska M, Rüter C, Bauwens A, Greune L, Jarosch KA, Steil D, Zhang W, He X, Llobes R, Fruth A, Kim KS, Schmidt MA, Dobrindt U, Mellmann A, Karch H. Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: Intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. *PLoS Pathog.* 2017; 13(2):e1006159.
268. Lee JC, Lee EJ, Lee JH, Jun SH, Choi CW, Kim SI, Kang SS, Hyun S. *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiol Lett.* 2012; 331(1):17-24.
269. Navarro-Garcia F, Ruiz-Perez F, Cataldi Á, Larzábal M. Type VI secretion system in pathogenic *Escherichia coli*: Structure, role in virulence, and acquisition. *Front Microbiol.* 2019; 10:1965.
270. Hsieh PF, Lu YR, Lin TL, Lai LY, Wang JT. *Klebsiella pneumoniae* Type VI secretion system contributes to bacterial competition, cell invasion, type-1 fimbriae expression, and *in vivo* colonization. *J Infect Dis.* 2019; 219(4):637-647.
271. De Araujo C, Balestrino D, Roth L, Charbonnel N, Forestier C. Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Research in Microbiology* 2010; 161(7):595-603.
272. Zuberi A, Ahmad N, Khan AU. CRISPRi induced suppression of fimbriae gene (*fimH*) of an uropathogenic *Escherichia coli*: An approach to inhibit microbial biofilms. *Front Immunol.* 2017; 8:1552.
273. Anastasi EM, Matthews B, Stratton HM, Katouli M. Pathogenic *Escherichia coli* found in sewage treatment plants and environmental waters. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(16):5536-5541.
274. Garénaux A, Caza M, Dozois CM. The ins and outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 2011; 153:89-98.
275. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 7th edition. Elsevier Saunders; 2012.
276. Clark RA. Resident memory T cells in human health and disease. *Sci Transl Med.* 2015; 7(269):269rv1.
277. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology: The immune system in health and disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001.
278. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010; 140(6):805-820.

BIBLIOGRAFÍA

279. Teng TS, Ji AL, Ji XY, Li YZ. Neutrophils and immunity: From bactericidal action to being conquered. *J Immunol Res.* 2017; 2017:9671604.
280. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18(2):134-147.
281. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity.* 2018; 49(4):595-613.
282. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol.* 2015; 33:643-675.
283. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17:593-623.
284. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:669-692.
285. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(11):762-774.
286. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003; 19(1):71-82.
287. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14(6):392-404.
288. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest.* 2007; 117(4):902-909.
289. Tacke F, Randolph G. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology.* 2006; 211(6-8):609-618.
290. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2008; 26:421-452.
291. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, Lang R, Haniffa M, Collin M, Tacke F, Habenicht AJ, Ziegler-Heitbrock L, Randolph GJ. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood.* 2010; 115(3):e10-9.
292. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol.* 2012; 13(12):1145-1154.

BIBLIOGRAFÍA

293. Macri C, Pang ES, Patton T, O'Keeffe M. Dendritic cell subsets. *Semin Cell Dev Biol.* 2018; 84:11-21.
294. Shortman K, Heath WR. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol Rev.* 2010; 234(1):18-31.
295. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC. Differential antigen processing by dendritic cell subsets *in vivo*. *Science.* 2007; 315(5808):107-111.
296. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(8):471-485.
297. Piccioli D, Sammicheli C, Tavarini S, Nuti S, Frigimelica E, Manetti AG, Nuccitelli A, Aprea S, Valentini S, Borgogni E, Wack A, Valiante NM. Human plasmacytoid dendritic cells are unresponsive to bacterial stimulation and require a novel type of cooperation with myeloid dendritic cells for maturation. *Blood.* 2009; 113(18):4232-4239.
298. Bekeredjian-Ding I, Greil J, Ammann S, Parcina M. Plasmacytoid dendritic cells: Neglected regulators of the immune response to *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol.* 2014; 23:5:238.
299. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity.* 19(1):59-70.
300. Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity.* 2014; 40(5):642-656.
301. Romani N, Brunner PM, Stingl G. Changing views of the role of Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 2012; 132(3 Pt 2):872-881.
302. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat Rev Immunol.* 2019; 19(2):89-103.
303. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 2010; 33(5):657-670.
304. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007; 317(5838):666-670.

BIBLIOGRAFÍA

305. Serbina NV, Shi C, Pamer EG. Monocyte-mediated immune defense against murine *Listeria monocytogenes* infection. *Adv Immunol.* 2012; 113:119-34.
306. Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, Pamer EG. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.* 2008; 180(10):6846-6853.
307. Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, Leiner I, Li MO, Frenette PS, Pamer EG. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity.* 2011; 34(4):590-601.
308. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol.* 2006; 7(3):311-317.
309. Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med.* 1997; 186(10):1757-1762.
310. Shi C, Velázquez P, Hohl TM, Leiner I, Dustin ML, Pamer EG. Monocyte trafficking to hepatic sites of bacterial infection is chemokine independent and directed by focal intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Immunol.* 2010; 184(11):6266-6274.
311. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, Klotman ME, Diaz GA. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet.* 2003; 34(1):70-74.
312. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* 2010; 120(7):2423-2431.
313. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(3):159-175.
314. van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17(7):407-420.
315. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity.* 2014. 40(4):463-475.

BIBLIOGRAFÍA

316. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part II: Role in immunity. *Front Immunol.* 2015; 6:257.
317. Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:821-852.
318. Keshari RS, Silasi R, Popescu NI, Patel MM, Chaaban H, Lupu C, Coggeshall KM, Mollnes TE, DeMarco SJ, Lupu F. Inhibition of complement C5 protects against organ failure and reduces mortality in a baboon model of *Escherichia coli* sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114(31):E6390-E6399.
319. Buras JA, Rice L, Orlow D, Pavlides S, Reenstra WR, Ceonzo K, Stahl GL. Inhibition of C5 or absence of C6 protects from sepsis mortality. *Immunobiology.* 2004; 209(8):629-635.
320. Levi M, van der Poll T. Coagulation and sepsis. *Thromb Res.* 2017; 149:38-44.
321. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence.* 2014; 5(1):36-44.
322. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1999; 27(7):1230-1251.
323. Inoue S, Suzuki K, Komori Y, Morishita Y, Suzuki-Utsunomiya K, Hozumi K, Inokuchi S, Sato T. Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. *Crit Care.* 2014; 18(3):R130.
324. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissières P, Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med.* 2013; 41(3):820-832.
325. Kovach MA, Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis.* 2012; 25(3):321-327.
326. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith C, Karl IE. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol.* 2002; 168(5):2493-2500.
327. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk HD, Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care.* 2009; 13(4):R119.
328. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol.* 2018; 14(2):121-137.

BIBLIOGRAFÍA

329. Farrell LJ, Lo R, Wanford JJ, Jenkins A, Maxwell A, Piddock LJV. Revitalizing the drug pipeline: AntibioticDB, an open access database to aid antibacterial research and development. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73(9):2284-2297.
330. Theuretzbacher U, Outterson K, Engel A, Karlén A. The global preclinical antibacterial pipeline. *Nat Rev Microbiol.* 2020; 18:275-285 .
331. Karaikos I, Souli M, Galani I, Giamarellou H. Colistin: still a lifesaver for the 21st century? *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017; 13(1):59-71.
332. Michalopoulos A, Virtzili S, Rafailidis P, Chalevelakis G, Damala M, Falagas ME. Intravenous fosfomicin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(2):184-186.
333. https://sede.isciii.gob.es/anouncements_detail.jsp?pub=20828. Fecha de acceso el 7 de abril de 2020.
334. Kakasis A, Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *Int J Antimicrob Agents.* 2019; 53(1):16-21.
335. Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE. Phage Therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe.* 2019; 25(2):219-232.
336. Salmond GP, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13(12):777-786.
337. Gordillo-Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clin Microbiol Rev.* 2019; 32(2):e00066-18.
338. Eliava Biopreparations. Bacteriophages for Human health, Veterinary and Environmental use. *Pyo Bacteriophage.*
339. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A Review. *Front Microbiol.* 2019; 10:539.
340. Rasko DA, Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(2):117-128.
341. Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6(1):17-27.
342. Mühlen S, Dersch P. Anti-virulence strategies to target bacterial infections. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2016; 398:147-183.

BIBLIOGRAFÍA

343. Fong J, Mortensen KT, Nørskov A, Qvortrup K, Yang L, Tan CH, Nielsen TE, Givskov M. Itaconimides as novel *quorum sensing* inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019; 8:443.
344. Li H, Qian L, Chen Z, Thibault D, Liu G, Liu T, Thanassi DG. The outer membrane usher forms a twin-pore secretion complex. *J Mol Biol*. 2004; 344(5):1397-1407.
345. Pinkner JS, Remaut H, Buelens F, Miller E, Aberg V, Pemberton N, Hedenström M, Larsson A, Seed P, Waksman G, Hultgren SJ, Almqvist F. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(47):17897-17902.
346. Lo AW, Van de Water K, Gane PJ, Chan AW, Steadman D, Stevens K, Selwood DL, Waksman G, Remaut H. Suppression of type 1 pilus assembly in uropathogenic *Escherichia coli* by chemical inhibition of subunit polymerization. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69(4):1017-1026.
347. Klein T, Abgottspon D, Wittwer M, Rabbani S, Herold J, Jiang X, Kleeb S, Lüthi C, Scharenberg M, Bezençon J, Gubler E, Pang L, Smiesko M, Cutting B, Schwardt O, Ernst B. FimH antagonists for the oral treatment of urinary tract infections: from design and synthesis to *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J Med Chem*. 2010; 53(24):8627-8641.
348. Vila-Farrés X, Parra-Millán R, Sánchez-Encinales V, Varese M, Ayerbe-Algaba R, Bayó N, Guardiola S, Pachón-Ibáñez ME, Kotev M, García J, Teixidó M, Vila J, Pachón J, Giralt E, Smani Y. Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. *Sci Rep*. 2017; 7(1):14683.
349. Defoirdt T. Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy. *Trends Microbiol*. 2018; 26(4):313-328.
350. Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol*. 2015; 64(Pt 4):323-334.
351. Paczkowski JE, Mukherjee S, McCready AR, Cong JP, Aquino CJ, Kim H, Henke BR4, Smith CD, Bassler BL. Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of Quorum-sensing receptors. *J Biol Chem*. 2017; 292(10):4064-4076.
352. Wu H, Song Z, Hentzer M, Andersen JB, Molin S, Givskov M, Høiby N. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in

BIBLIOGRAFÍA

- Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. J Antimicrob Chemother. 2004; 53(6):1054-1061.
353. Gupta P, Chhibber S, Harjai K. Efficacy of purified lactonase and ciprofloxacin in preventing systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* in murine burn wound model. Burns. 2015; 41(1):153-162.
354. Lesic B, Lépine F, Déziel E, Zhang J, Zhang Q, Padfield K, Castonguay MH, Milot S, Stachel S, Tzika AA, Tompkins RG, Rahme LG. Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. PLoS Pathog. 2007; 3(9):1229-1239.
355. Rémy B, Mion S, Plener L, Elias M, Chabrière E, Daudé D. Interference in bacterial quorum sensing: A biopharmaceutical perspective. Front Pharmacol. 2018; 9:203.
356. Galán JE, Waksman G. Protein-injection machines in bacteria. Cell. 2018; 172(6):1306-1318.
357. Linington RG, Robertson M, Gauthier A, Finlay BB, MacMillan JB, Molinski TF, van Soest R, Andersen RJ. Caminosides B-D, antimicrobial glycolipids isolated from the marine sponge *Caminus sphaeroconia*. J Nat Prod. 2006; 69(2):173-177.
358. Anantharajah A, Mingeot-Leclercq MP, Van Bambeke F. Targeting the type three secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. Trends Pharmacol Sci. 2016; 37(9):734-749.
359. Armstrong GD, Rowe PC, Goodyer P, Orrbine E, Klassen TP, Wells G, MacKenzie A, Lior H, Blanchard C, Auclair F. A phase I study of chemically synthesized verotoxin (Shiga-like toxin) Pk-trisaccharide receptors attached to chromosorb for preventing hemolytic-uremic syndrome. J Infect Dis. 1995; 171(4):1042-1045.
360. Dickey SW, Cheung GYC, Otto M. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. Nat Rev Drug Discov. 2017; 16(7):457-471.
361. Smani Y, Pachón-Ibáñez ME, Pachón J. New molecules and adjuvants in the treatment of infections by *Acinetobacter baumannii*. Expert Opin Pharmacother. 2016; 17(9):1207-1214.
362. Perrin-Cocon L, Agaugué S, Coutant F, Saint-Mézard P, Guironnet-Paquet A, Nicolas JF, André P, Lotteau V. Lysophosphatidylcholine is a natural adjuvant that initiates cellular immune responses. Vaccine. 2006; 24(9):1254-1263.

BIBLIOGRAFÍA

363. Yan JJ, Jung JS, Lee JE, Lee J, Huh SO, Kim HS, Jung KC, Cho JY, Nam JS, Suh HW, Kim YH, Song DK. Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. *Nat Med.* 2004; 10(2):161-167.
364. Smani Y, Domínguez-Herrera J, Ibáñez-Martínez J, Pachón J. Therapeutic efficacy of lysophosphatidylcholine in severe infections caused by *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(7):3920-3924.
365. Parra-Millán R, Jiménez-Mejías ME, Sánchez-Encinales V, Ayerbe-Algaba R, Gutiérrez-Valencia A, Pachón-Ibáñez ME, Díaz C, Pérez Del Palacio J, López-Cortés LF, Pachón J, Smani Y. Efficacy of lysophosphatidylcholine in combination with antimicrobial agents against *Acinetobacter baumannii* in experimental murine peritoneal sepsis and pneumonia models. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(8):4464-4470.
366. Parra-Millán R, Jiménez-Mejías ME, Ayerbe-Algaba R, Domínguez-Herrera J, Díaz-Navarro C, Pérez del Palacio J, Pachón J, Smani Y. Impact of the immune response modification by lysophosphatidylcholine in the efficacy of antibiotic therapy of experimental sepsis and pneumonia by *Pseudomonas aeruginosa*. Preprints 2020, doi: 10.20944/preprints202002.0171.v1.
367. Kaufmann SHE, Dorhoi A, Hotchkiss RS, Bartenschlager R. Host-directed therapies for bacterial and viral infections. *Nat Rev Drug Discov.* 2018; 17(1):35-56.
368. Patil NK, Guo Y, Luan L, Sherwood ER. Targeting immune cell checkpoints during sepsis. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(11):2413.
369. Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 2006; 24(12):1551-1557.
370. Maisetta G, Batoni G, Esin S, Florio W, Bottai D, Favilli F, Campa M. *In vitro* bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(2):806-809.
371. Feng Z, Jia X, Adams MD, Ghosh SK, Bonomo RA, Weinberg A. Epithelial innate immune response to *Acinetobacter baumannii* challenge. *Infect Immun.* 2014; 82(11):4458-4465.
372. Spencer JJ, Pitts RE, Pearson RA, King LB. The effects of antimicrobial peptides WAM-1 and LL-37 on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Pathog Dis.* 2018; 76(2): fty007

BIBLIOGRAFÍA

- 373.** Wnorowska U, Niemirowicz K, Myint M, Diamond SL, Wróblewska M, Savage PB, Janmey PA, Bucki R. Bactericidal activities of cathelicidin LL-37 and select cationic lipids against the hypervirulent *Pseudomonas aeruginosa* strain LESB58. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(7):3808-3815.
- 374.** Al-Farsi HM, Al-Adwani S, Ahmed S, Vogt C4, Ambikan AT, Leber A, Al-Jardani A, Al-Azri S, Al-Muharmi Z, Toprak MS, Giske CG, Bergman P. Effects of the antimicrobial peptide LL-37 and innate effector mechanisms in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* with mgrB insertions. *Front Microbiol.* 2019; 10:2632.
- 375.** Pulido MR, García-Quintanilla M, Pachón J, McConnell MJ. Immunization with lipopolysaccharide-free outer membrane complexes protects against *Acinetobacter baumannii* infection. *Vaccine.* 2018; 36(29):4153-4156.
- 376.** Cabral MP, García P, Beceiro A, Rumbo C, Pérez A, Moscoso M, Bou G. Design of live attenuated bacterial vaccines based on D-glutamate auxotrophy. *Nat Commun.* 2017; 8:15480.
- 377.** McConnell MJ. Where are we with monoclonal antibodies for multidrug-resistant infections?. *Drug Discov Today.* 2019; 24(5):1132-1138.
- 378.** García-Quintanilla M, Pulido MR, Carretero-Ledesma M, McConnell MJ. Vaccines for antibiotic-resistant bacteria: Possibility or pipe dream? *Trends Pharmacol Sci.* 2016; 37(2):143-152.
- 379.** Ali SO, Yu XQ, Robbie GJ, Wu Y, Shoemaker K1, Yu L, DiGiandomenico A, Keller AE, Anude C, Hernandez-Illas M, Bellamy T, Falloon J, Dubovsky F, Jafri HS. Phase 1 study of MEDI3902, an investigational anti-*Pseudomonas aeruginosa* PcrV and Psl bispecific human monoclonal antibody, in healthy adults. *Clin Microbiol Infect.* 2019; 25(5):629.e1-629.e6.
- 380.** Farha MA, Brown ED. Drug repurposing for antimicrobial discovery. *Nat Microbiol.* 2019; 4(4):565-577.
- 381.** Montoya MC, Krysan DJ. Repurposing estrogen receptor antagonists for the treatment of infectious disease. *mBio.* 2018; 9:e02272-18.
- 382.** Gerits E, Defraigne V, Vandamme K, De Cremer K, De Brucker K, Thevissen K, Cammue BP, Beullens S, Fauvart M, Verstraeten N, Michiels J. Repurposing toremifene for treatment of oral bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(3):e01846-16.

BIBLIOGRAFÍA

- 383.** Ho Sui SJ, Lo R, Fernandes AR, Caulfield MD, Lerman JA, Xie L, Bourne PE, Baillie DL, Brinkman FS. Raloxifene attenuates *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin production and virulence. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 40(3):246-251.
- 384.** Chen W, Mook RA Jr, Premont RT, Wang J. Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. *Cell Signal*. 2018; 41:89-96.
- 385.** Martin RJ. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J*. 1997; 154(1):11-34.
- 386.** Li Y, Li PK, Roberts MJ, Arend RC, Samant RS, Buchsbaum DJ. Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: A new application for an old drug. *Cancer Lett*. 2014; 349(1):8-14.
- 387.** Rajamuthiah R, Fuchs BB, Conery AL, Kim W, Jayamani E, Kwon B, Ausubel FM, Mylonakis E. Repurposing salicylanilide anthelmintic drugs to combat drug resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*. 2015; 10(4):e0124595.
- 388.** Gooyit M, Janda KD. Reprofiled anthelmintics abate hypervirulent stationary-phase *Clostridium difficile*. *Sci Rep*. 2016; 6:33642.
- 389.** Tam J, Hamza T, Ma B, Chen K, Beilhartz GL, Ravel J, Feng H, Melnyk RA. Host-targeted niclosamide inhibits *C. difficile* virulence and prevents disease in mice without disrupting the gut microbiota. *Nat Commun*. 2018; 9(1):5233.
- 390.** Imperi F, Massai F, Ramachandran Pillai C, Longo F, Zennaro E, Rampioni G, Visca P, Leoni L. New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(2):996-1005.
- 391.** Tharmalingam N, Port J, Castillo D, Mylonakis E. Repurposing the anthelmintic drug niclosamide to combat *Helicobacter pylori*. *Sci Rep*. 2018; 8(1):3701.
- 392.** Ayerbe-Algaba R, Gil-Marqués ML, Jiménez-Mejías ME, Sánchez-Encinales V, Parra-Millán R, Pachón-Ibáñez ME, Pachón J, Smani Y. Synergistic activity of niclosamide in combination with colistin against colistin-susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 8:348.
- 393.** Ayerbe-Algaba R, Gil-Marqués ML, Miró-Canturri A, Parra-Millán R, Pachón-Ibáñez ME, Jiménez-Mejías ME, Pachón J, Smani Y. The anthelmintic oxyclozanide restores the activity of colistin against colistin-resistant Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents*. 2019; 54(4):507-512.

BIBLIOGRAFÍA

394. Maiden MM, Zachos MP, Waters CM. The ionophore oxyclozanide enhances tobramycin killing of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by permeabilizing cells and depolarizing the membrane potential. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74(4):894-906.
395. Soo VW, Kwan BW, Quezada H, Castillo-Juárez I, Pérez-Eretza B, García-Contreras SJ, Martínez-Vázquez M, Wood TK, García-Contreras R. Repurposing of anticancer drugs for the treatment of bacterial infections. *Curr Top Med Chem.* 2017; 17(10):1157-1176.
396. Corriden R, Hollands A, Olson J, Derieux J, Lopez J, Chang JT, Gonzalez DJ, Nizet V. Tamoxifen augments the innate immune function of neutrophils through modulation of intracellular ceramide. *Nat Commun.* 2015; 6:8369.
397. Xue H, Li J, Xie H, Wang Y. Review of drug repositioning approaches and resources. *Int J Biol Sci.* 2018; 14(10):1232-1244.
398. Wright GD. Antibiotic adjuvants: Rescuing antibiotics from resistance. *Trends Microbiol.* 2016; 24(11):862-871.
399. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(3):173-182.
400. Lee CR, Zeldin DC. Resolvin infectious inflammation by targeting the host response. *N Engl J Med.* 2015; 373(22):2183-2185.
401. Dalli J, Chiang N, Serhan CN. Elucidation of novel 13-series resolvins that increase with atorvastatin and clear infections. *Nat Med.* 2015; 21(9):1071-1075.
402. Jordan VC. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2(3):205-213.
403. Behjati S, Frank MH. The effects of tamoxifen on immunity. *Curr Med Chem.* 2009; 16(24):3076-3080.
404. Kovats S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell Immunol.* 2015; 294(2):63-69.
405. O'Brian CA, Liskamp RM, Solomon DH, Weinstein IB. Inhibition of protein kinase C by tamoxifen. *Cancer Res.* 1985; 45(6):2462-2465.
406. McGlynn LM, Kirkegaard T, Edwards J, Tovey S, Cameron D, Twelves C, Bartlett JM, Cooke TG. Ras/Raf-1/MAPK pathway mediates response to tamoxifen but not chemotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(4):1487-1495.

BIBLIOGRAFÍA

407. Dolan K, Montgomery S, Buchheit B, Didone L, Wellington M, Krysan DJ. Antifungal activity of tamoxifen: *in vitro* and *in vivo* activities and mechanistic characterization. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(8):3337-3346.
408. Jang WS, Kim S, Podder B, Jyoti MA, Nam KW, Lee BE, Song HY. Antimycobacterial activity of tamoxifen against drug-resistant and intra-macrophage *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Biotechnol.* 2015; 25(6):946-950.
409. Jacobs AC, Didone L, Jobson J, Sofia MK, Krysan D, Dunman PM. Adenylate kinase release as a high-throughput-screening-compatible reporter of bacterial lysis for identification of antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(1):26-36.
410. Robins HI, Won M, Seiferheld WF, Schultz CJ, Choucair AK, Brachman DG, Demas WF, Mehta MP. Phase 2 trial of radiation plus high-dose tamoxifen for glioblastoma multiforme: RTOG protocol BR-0021. *Neuro Oncol.* 2006; 8(1):47-52.
411. Stephen X. Skapek, James R. Anderson, D. Ashley Hill, David Henry, Sheri L. Spunt, William Meyer, Simon Kao, Fredric A. Hoffer, Holcombe E. Grier, Douglas S. Hawkins, R. Beverly Raney. Safety and efficacy of high-dose tamoxifen and sulindac for desmoid tumor in children: Results of a Children's Oncology Group (COG) Phase II study. *Pediatr Blood Cancer.* 2013; 60(7):1108-1112.
412. Lakshmi N Yatham, Sidney H Kennedy, Sagar V Parikh, Ayal Schaffer, David J Bond, Benicio N Frey, Verinder Sharma, Benjamin I Goldstein, Soham Rej, Serge Beaulieu, Martin Alda, Glenda MacQueen, Roumen V Milev, Arun Ravindran, Claire O'Donovan, Diane McIntosh, Raymond W Lam, Gustavo Vazquez, Flavio Kapczinski, Roger S McIntyre, Jan Kozicky, Shigenobu Kanba, Beny Lafer, Trisha Suppes, Joseph R Calabrese, Eduard Vieta, Gin Malhi, Robert M Post, Michael Berk. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) 2018 guidelines for the management of patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2018; 20(2):97-170.
413. Seli E, Pehlivan T, Selam B, Garcia-Velasco JA, Arici A. Estradiol down-regulates MCP-1 expression in human coronary artery endothelial cells. *Fertil Steril.* 2002; 77(3):542-547.

BIBLIOGRAFÍA

414. Wang L, Zheng W, Zhang S, Chen X, Hornung D. Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human endometrial cancer cells and the effect of treatment with tamoxifen or buserelin. *J Int Med Res.* 2006; 34(3):284-290.
415. Talbot J, Bianchini FJ, Nascimento DC, Oliveira RD, Souto FO, Pinto LG, Peres RS, Silva JR, Almeida SC, Louzada-Junior P, Cunha TM, Cunha FQ, Alves-Filho JC. CCR2 expression in neutrophils plays a critical role in their migration into the joints in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67(7):1751-1759.
416. Balamayooran G, Batra S, Balamayooran T, Cai S, Jeyaseelan S. Monocyte chemoattractant protein 1 regulates pulmonary host defense via neutrophil recruitment during *Escherichia coli* infection. *Infect Immun.* 2011; 79(7):2567-2577.
417. Takahashi M, Galligan C, Tessarollo L, Yoshimura T. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), not MCP-3, is the primary chemokine required for monocyte recruitment in mouse peritonitis induced with thioglycollate or zymosan A. *J Immunol.* 2009; 183(5):3463-3471.
418. Schultz MJ, Knapp S, Florquin S, Pater J, Takeda K, Akira S, van der Poll T. Interleukin-18 impairs the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 2003; 71(4):1630-1634.
419. Domínguez PM, Ardavín C. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev.* 2010; 234(1):90-104.
420. Rothe J, Lesslauer W, Lötscher H, Lang Y, Koebel P, Köntgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, Bluethmann H. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature.* 1993; 364(6440):798-802.
421. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell.* 1995; 81(4):641-650.
422. Bosschaerts T, Guilliams M, Stijlemans B, Morias Y, Engel D, Tacke F, Héryn M, De Baetselier P, Beschin A. Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling. *PLoS Pathog.* 2010; 6(8):e1001045.

BIBLIOGRAFÍA

423. Pfeffer K, Matsuyama T, Kündig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Krönke M, Mak TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*. 1993; 73(3):457-467.
424. Nalbandian G, Paharkova-Vatchkova V, Mao A, Nale S, Kovats S. The selective estrogen receptor modulators, tamoxifen and raloxifene, impair dendritic cell differentiation and activation. *J Immunol*. 2005; 175(4):2666-2675.
425. Shagufta Ahmad I. Tamoxifen a pioneering drug: An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives. *Eur J Med Chem*. 2018; 143:515-531.
426. Silva ON, de la Fuente-Núñez C, Haney EF, Fensterseifer ICM, Ribeiro SM, Porto WF, Brown P, Faria-Junior C, Rezende TMB, Moreno SE, Lu TK, Hancock EW, Franco LO. An anti-infective synthetic peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activities. *Sci Rep*. 2016; 6:35465.
427. Selyunin AS, Hutchens S, McHardy SF, Mukhopadhyay S. Tamoxifen blocks retrograde trafficking of Shiga toxin 1 and 2 and protects against lethal toxicosis. *Life Sci Alliance*. 2019; 2(3): e201900439.
428. Nataro JP, Pickering LK. In Oski's Paediatrics: principles and practice. 2006. McMillan JA, Feigin RD, DeAngelis CD, Douglas Jones M Jr (eds).1063-1068. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
429. Mathieu J. Interactions between autophagy and bacterial toxins: targets for therapy? *Toxins (Basel)*. 2015; 7(8):2918-2958.
430. Mora-Rillo M, Fernández-Romero N, Navarro-San Francisco C, Díez-Sebastián J, Romero-Gómez MP, Fernández FA, López JRA, Mingorance J. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. *Virulence*. 2015; 6(1):93-100.
431. Hussein MH, Schneider EK, Elliott AG, Han M, Reyes-Ortega F, Morris F, Blastovich MAT, Jasim R, Currie B, Mayo M, Baker M, Cooper M, Li J, Velkov T. From breast cancer to antimicrobial: Combating extremely resistant Gram-negative "Superbugs" using novel combinations of polymyxin B with selective estrogen receptor modulators. *Microb Drug Resist*. 2017; (5):640-650.
432. Ngan NTT, Mai NTH, Tung NLN, Lan NPH, Tai LTH, Phu NH, Chau NVV, Binh TQ, Hung LQ, Beardsley J, White N, Lalloo D, Krysan D, Hope W, Geskus R, Wolbers M, Nhat LTH, Thwaites G, Kestelyn E, Day J. A randomized open

BIBLIOGRAFÍA

- label trial of tamoxifen combined with amphotericin B and fluconazole for cryptococcal meningitis. *Wellcome Open Res.* 2019; 4:8.
433. Jung E, Nam S, Oh H, Jun S, Ro HJ, Kim B, Kim M, Go YY. Neutralization of acidic intracellular vesicles by niclosamide inhibits multiple steps of the dengue virus life cycle *in vitro*. *Sci Rep.* 2019; 9(1):8682.
434. Marrugal-Lorenzo JA, Serna-Gallego A, Berastegui-Cabrera J, Pachón J, Sánchez-Céspedes J. Repositioning salicylanilide anthelmintic drugs to treat adenovirus infections. *Sci Rep.* 2019; 9(1):17.
435. Dehdashti SJ, Abbott J, Nguyen DT, McKew JC, Williamson PR, Zheng W. A high-throughput screening assay for assessing the viability of *Cryptococcus neoformans* under nutrient starvation conditions. *Anal Bioanal Chem.* 2013; 405(21):6823-6829.
436. Burock S, Daum S, Keilholz U, Neumann K, Walther W, Stein U. Phase II trial to investigate the safety and efficacy of orally applied niclosamide in patients with metachronous or synchronous metastases of a colorectal cancer progressing after therapy: the NIKOLO trial. *BMC Cancer.* 2018; 18(1):297.
437. Stephen W. Chapter 10: Antiparasitic drugs. *Small Animal Clinical Pharmacology (Second Edition)*, 2008; 198-260.
438. Levinson MR, Blondeau JM, Rosenkrantz WS, Plowgian CB. The *in vitro* antibacterial activity of the anthelmintic drug oxyclozanide against common small animal bacterial pathogens. *Vet Dermatol.* 2019; 30(4):314-e87.
439. Domalaon R, De Silva PM, Kumar A, Zhanel GG, Schweizer F. The anthelmintic drug niclosamide synergizes with colistin and reverses colistin resistance in Gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63(4):e02574-18.
440. Domalaon R, Okunnu O, Zhanel GG, Schweizer F. Synergistic combinations of anthelmintic salicylanilides oxyclozanide, radoxanide, and closantel with colistin eradicates multidrug-resistant colistin-resistant Gram-negative bacilli. *J Antibiot (Tokyo).* 2019; 72(8):605-616.
441. 70. Chen HD, Groisman EA. The biology of the PmrA/PmrB two-component system: the major regulator of lipopolysaccharide modifications. *Annu Rev Microbiol.* 2013; 67:83-112.
442. Haeili M, Javani A, Moradi J, Jafari Z, Feizabadi MM, Babaei E. MgrB Alterations mediate colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. *Front Microbiol.* 2017; 8:2470.

BIBLIOGRAFÍA

443. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Viola V, Tryfinopoulou K, Vatopoulos A, Rossolini GM. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(10):5696-5703.
444. Soon RL, Nation RL, Cockram S, Moffatt JH, Harper M, Adler B, Boyce JD, Larson I, Li J. Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(1):126-133.
445. Velkov T, Deris ZZ, Huang JX, Azad MA, Butler M, Sivanesan S, Kaminskas LM, Dong YD, Boyd B, Baker MA, Cooper MA, Nation RL, Li J. Surface changes and polymyxin interactions with a resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Innate Immun.* 2014; 20(4):350-363.
446. Lima MR, Ferreira GF, Nunes Neto WR, Monteiro JM, Santos ÁRC, Tavares PB, Denadai ÂML, Bomfim MRQ, Dos Santos VL, Marques SG, de Souza Monteiro A. Evaluation of the interaction between polymyxin B and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cells: reactive oxygen species induction and zeta potential. *BMC Microbiol.* 2019; 19(1):115.
447. Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012; 10(8):917-934.
448. Wu CS, Li YR, Chen JJ, Chen YC, Chu CL, Pan IH, Wu YS, Lin CC. Antihelminthic niclosamide modulates dendritic cells activation and function. *Cell Immunol.* 2014; 288(1-2):15-23.
449. Jin Y, Lu Z, Ding K, Li J, Du X, Chen C, Sun X, Wu Y, Zhou J, Pan J. Antineoplastic mechanisms of niclosamide in acute myelogenous leukemia stem cells: inactivation of the NF-kappaB pathway and generation of reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2010; 70(6):2516-2527.
450. Rahman MM, McFadden G. Modulation of NF-κB signalling by microbial pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9(4):291-306.
451. Liu SF, Malik AB. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290(4):L622-L645.

BIBLIOGRAFÍA

- 452.** Grayson ML, Cosgrove SE, Crowe S, Hope W, McCarthy JS, Mills J, Mouton JW, Paterson DL. Kucers' The use of antibiotics: A clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic and antiviral drugs. 7th Edition. 2017:1-4841.
- 453.** Swan GE. The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. J S Afr Vet Assoc. 1999; 70(2):61-70.