



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BÚSQUEDA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A
LA NITROFURANTOÍNA EN
Salmonella enterica

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

BIOLOGA

PRESENTA

CLAUDIA BARAJAS LEMUS

DIRECTOR DE TESIS: *Dr. Rafael Camacho Carranza*



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Apoyos financieros

Agradezco al Programa Nacional de Becas para la Educación Superior por la beca otorgada durante 30 meses.

Académicos

Con mi más franca actitud de respeto y admiración al Dr. Rafael Camacho Carranza por la aceptación, dirección e invaluable ayuda para la realización de este trabajo.

Con mi más franca admiración a la Dra. Patricia Ramos Morales por todo el apoyo y asesoría brindada en todo momento que lo requerí.

Al Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre por su orientación y valiosa asesoría.

A la Dra. Regina Dorinda Montero Montoya por la revisión de esta tesis y por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Víctor Manuel Valdés López por sus aportaciones y comentarios para la realización de este trabajo.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por la revisión de esta tesis y por sus atenciones.

Técnicos

A la M. en C. Diana Escobar García por el apoyo técnico y su valiosa asesoría en el trabajo de laboratorio.

A la Bióloga Sandra Luz Hernández Ojeda por el apoyo técnico brindado en este trabajo.

A la Dra. Sandra Giobanna Salamanca Pinzón, por su valiosa asesoría en el presente trabajo y especialmente en el ensayo de Actividad Enzimática.

A la Q.F.B. Blanca Estela Hernández Guadarrama, por el apoyo técnico brindado en la técnica de PCR y por su invaluable amistad.

Al Q.F.B. Juan Carlos Velazquez Castro, por el apoyo técnico brindado en el laboratorio.

Institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por todas las herramientas teóricas y técnicas brindadas para mi formación profesional y humana.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México por la invaluable formación profesional proporcionada.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, lugar donde se realizó el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a mis padres Manuel Barajas Magaña y Margarita Lemus Martínez, por absolutamente todo el apoyo incondicional brindado, principalmente en los momentos más difíciles. Gracias por darme la fortaleza, la confianza, el valor de seguir adelante, no importa lo difícil y oscuro que el sendero se presente ante mí, gracias a ustedes seguiré avanzando hasta el final de mis días pues la luz más brillante renace de la oscuridad más profunda.

A mi familia: mil gracias a todos ustedes que creyeron en mí (Especialmente a mis tíos Gerardo Barajas, Refugio Barajas, Rosaura Lemus, Esther Lemus y Alicia Lemus), gracias a su apoyo llegué hasta aquí. Y para aquellos que no creyeron he aquí la prueba de su error.

Un millón de gracias a mi segunda familia “mis amigos”, por absolutamente todos los excelentes ratos que compartimos juntos, por que son el otro pilar que me sostiene y ustedes han hecho milagros en los momentos requeridos:

A Laura y Lucila mis amigas y compañeras de penas en los momentos mas difíciles. Mis cómplices y verdugos en los momentos más divertidos y absurdos de mi vida.

A Elena mi hermana de carrera con quien compartí momentos difíciles y divertidos a lo largo de nuestra estancia en la Facultad.

A Blanca y Coni un profundo agradecimiento por su amistad, apoyo y sobre todo paciencia para con esta pobre inadaptada.

A mis compañeros de generación por su compañía y apoyo.

A mis compañeros del laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental mil gracias por conseguir que mi estancia se hiciera muy agradable y divertida.

A las Familia Barrera Medina y La familia de Torres Sandi por acogerme en su seno y apoyarme en momentos difíciles de la carrera.

A todos ustedes ;;;; MIL GRACIAS!!!!

DEDICATORIAS

Con todo mi corazón dedico esta tesis:

A mis padres, con mi más profundo agradecimiento por todo su amor y apoyo, por que me han otorgado tesoros invaluable: la vida, el valor y la educación.

A mis dos latosos hermanos Manuel y Jacqueline, por su compañía, extraño cariño y apoyo.

A aquellos que se fueron de este mundo no sin antes brindarme su confianza, cariño y apoyo: Mi Tía Alicia Lemus, Mis abuelos Francisco Lemus y Esther Martínez.

A mis abuelos Trinidad Barajas y Emiliana Magaña por su cariño y apoyo.

A Ana Laura Hernández y Lucila Cervantes por su amistad y apoyo en los momentos más difíciles de mi vida. ¡Gracias por rescatarme del oscuro agujero en el que me encontraba! gracias a ustedes y a mi familia hoy soy capaz de vislumbrar por primera vez un futuro.

A todos los profesores y académicos de la Facultad de Ciencias ¡Mil gracias por todo!

R E S U M E N

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente que se relaciona con la autoprescripción de medicamentos aunado con la gran plasticidad de los organismos procariontes. Los mecanismos implicados con la resistencia a Nitrofurantoína, su permeabilidad y transporte aun se desconocen. En el presente trabajo se describe la exploración de estos mecanismos en *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* LT2; para lo cual se construyeron 23 cepas mutantes resistentes a $20\mu\text{gml}^{-1}$ de Nitrofurantoína vía transposición aleatoria con un elemento Mud-Cam. Estas inserciones fueron usadas como una referencia para ubicar el contexto del sitio de inserción del transposón; se mapearon usando diferentes estrategias; genéticas, como el mapeo por coeficientes de cotransducción y la construcción de un Interposon; y moleculares, como amplificación por PCR entre dos elementos transponibles insertos a una mínima distancia, mapeo físico por Electroforesis de Campo Pulsado y PCR semialeatorio. Con esta metodología se logró localizar el transposon Mud-cam en la cepa RC1488, el cual se insertó en una secuencia intergénica ubicada entre *glnP* y *glnH* correspondientes al componente de membrana del transportador ABC de glutamina y la proteína de unión de alta afinidad para el transporte de la glutamina respectivamente, relacionando ésta inserción con el fenotipo de resistencia a la Nitrofurantoína en esta cepa. Otra de las inserciones Mud-Cam fue localizada en la cepa RC1499 ubicada en la posición +214 cerca del gen *mdaA* relacionado con la expresión de la nitrorreductasa clásica *SnrA* de *Salmonella tyhimurium*, lo que fue corroborado mediante un ensayo de actividad enzimática. Con la metodología descrita no fue posible localizar las inserciones de las 21 cepas restantes.

A B R E V I A T U R A S

ABC	Adenosine triphosphate-Binding Cassette
Amp ^R	Ampicilina Resistencia
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CHEF	Contour-clamped homogeneous electric field
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Cm ^R	Cloramfenicol Resistencia
Cm ^S	Cloramfenicol Sensible
ELC	Extracto Libre de Células
FMN	Flavin mononucleótido
IS	Secuencias de Inserción
kDa	Kilo Daltons
kpb	Kilopares de bases
MDR	Resistencia Múltiple a Drogas
NADH	β-nicotinamida adenindinucleotido
NADPH	β-nicotinamida adenindinucleotido fosfato
NB	Nutrient Broth
NFN	Nitrofurantoína
Nf ^R	Nitrofurantoína Resistencia
nm	Nanometros
NR	Nitrorreductasa
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimeraza
PIB	Producto Interno Bruto
PFGE	Electroforesis de campo pulsante (Pulse Field Gradient Electrophoresis)
rpm	Revoluciones por minuto
Tc ^R	Tetraciclina Resistencia
TNT	2,4,6-trinitrotolueno
URF	Unidentified Reading Frame
UV	Luz Ultravioleta
WT	Wild Tipe (Cepa Silvestre)

C O N T E N I D O

1. INTRODUCCIÓN

1.1 IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS SOBRE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.....11

1.2 LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS

1.2.1 Tipos de resistencia bacteriana..... 12

1.2.2 Nitrofurantoína..... 13

1.3 LAS NITRORREDUCTASAS

1.3.1 ¿Qué son las nitrorreductasas?.....14

1.3.2 Importancia de las nitrorreductasas.....14

1.3.3 Clasificación de las nitrorreductasas.....15

1.3.4 Las nitrorreductasas en *Salmonella enterica*.....15

1.3.5 Evidencias de la existencia de la tercera nitrorreductasa.....16

1.4 LOS TRANSPOSONES COMO HERRAMIENTA EN LA INDUCCIÓN DE MUTACIONES.17

1.4.1 El Transposon Tn10.....18

1.4.2 El elemento Mu.....18

1.5 ELECTROFORESIS DE GRADIENTE DE CAMPO PULSADO COMO HERRAMIENTA DE MAPEO DE MUTACIONES EN *Salmonella enterica*.....18

2. HIPÓTESIS.....20

3. OBJETIVO GENERAL.....20

4. OBJETIVOS PARTICULARES.....20

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....21

5.1 CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS RC1484-RC1502 y RC1504-RC1507.....21

5.1.1 Inducción de mutaciones mediante transducción.....21

5. 1. 2	Selección de bacterias transductantes.....	21
5. 2	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).....	22
5. 3	AISLAMIENTO Y CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS OBTENIDAS.....	22
5. 4	MAPEO.....	22
5. 4. 1	Transducción de cepas para calculo de distancia entre elementos por coeficientes de transducción.....	22
5. 4. 2	Coefficientes de cotransducción.....	24
5. 4. 3	PFGE.....	24
5. 4. 4	PCR Semialeatorio.....	26
5.4.4.1	Cepas.....	27
5.4.4.2	Condiciones de corrida.....	27
5.4.4.3	Mezclas de reacción.....	28
5.4.4.4	Geles.....	28
5.4.4.5	Combinaciones de Oligonucleótidos.....	28
5. 4. 5	Prueba de dependencia.....	29
5. 4. 6	Secuenciación.....	31
5. 5	CONSTRUCCIÓN DE UN INTERPOSÓN.....	32
5. 5. 1	Construcción de la cepa RC1585.....	33
5. 5. 2	Transducción entre la cepa RC1585 y RC1048.....	34
5. 5. 3	Confirmación de construcción del interposón.....	35
5. 6	ACTIVIDAD.....	36
5. 6. 1	Preparación de Citosol o Extracto Libre de Células (ELC).....	37
5. 6. 2	Actividad Nitrorreductasa.....	37
5. 7	PCR entre transposones próximos.....	38
6.	RESULTADOS.....	40
6. 1	CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS RC1484-RC1502 y RC1504-RC1507	40
6. 2	INTERPOSÓN.....	40
6. 2. 1	Construcción de la cepa RC1585.....	40
6. 2. 2	Transducción entre la cepa RC1585 y RC1048.....	40

6. 2. 3	Replica de placa (Replica Printing).....	41
6. 2. 4	Confirmación de la construcción del interposón.....	41
6. 3	COEFICIENTES DE COTRANSDUCCIÓN.....	42
6. 4	CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (CMI).....	44
6. 5	ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE).....	47
6. 6	PCR ENTRE DOS TRANSPOSONES.....	48
6. 7	PCR SEMIALEATORIO.....	51
6. 8	SECUENCIACIÓN.....	54
6. 9	TRANSPORTADOR ABC.....	55
6.10	ACTIVIDAD.....	56
7.	DISCUSIÓN.....	59
7. 1	CONSTRUCCIÓN DEL INTERPOSÓN.....	59
7. 2	DETERMINACIÓN DEL CMI.....	60
7. 3	MAPEO POR COTRANSDUCCIÓN Y PCR.....	60
7. 4	MAPEO POR PFGE.....	61
7. 5	MAPEO POR PCR SEMIALEATORIO.....	61
7. 6	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	62
7. 7	EL TRANSPORTADOR ABC.....	63
8.	CONCLUSIONES.....	65
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	66
10.	ANEXO.....	72

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de los estudios sobre la resistencia a los antibióticos.

Desde el descubrimiento de la Penicilina por Fleming en 1928 y a lo largo de la historia, el uso de fármacos para combatir enfermedades bacterianas se ha ido generalizando, sin embargo conforme su uso se ha ido incrementando también han surgido organismos capaces de sobrevivir a la acción de dichos compuestos, fenómeno al cual se le conoce como resistencia, que es caracterizado por la refractariedad parcial o total del microorganismo hacia el efecto del fármaco.

Este es un problema multifacético con graves repercusiones tanto a nivel de salud como económico.

La resistencia de los microorganismos a los antibióticos ha tenido grandes repercusiones en la población a nivel mundial, por dar un ejemplo en 1972 tanto en México como en Centroamérica se identificó un brote de *Salmonella typhi* de cuyas cepas más del 75% presentaban resistencia a cloranfenicol y más de 92% de las cepas presentaron también resistencia a tetraciclina, estreptomina y sulfonamidas.^{65,68}

Debido a la frecuencia con que se presentan las enfermedades respiratorias y diarreicas (en especial en los países en vías de desarrollo) la prescripción y la automedicación de antibióticos para las mismas se ve favorecida. Se ha considerado que el uso inapropiado o excesivo de antibióticos favorece la aparición de cepas resistentes, fenómeno que se ha hecho evidente en el ámbito hospitalario.³¹

La resistencia en algunos microorganismos patógenos a los antibióticos se ha asociado principalmente a presiones selectivas relacionadas con el uso inadecuado de estos agentes antimicrobianos. En Canadá un estudio realizado por Chen et al., entre los años 1988 y 1998 mostró una correlación entre el aumento de las prescripciones de fluoroquinolonas y un incremento en la frecuencia de cepas resistentes de *Streptococcus pneumoniae*.

De acuerdo con la Oficina de evaluación de Tecnología de los E.E.U.U., los antibióticos son los segundos medicamentos más comúnmente prescritos en los Estados Unidos, estimándose que anualmente se administran de 200 a 300 millones de antimicrobianos en E.E.U.U., de los cuales el 45% son para uso externo y del 25 al 40% para pacientes hospitalizados.⁵⁴ Aunado a esto un gran número de estudios han sugerido que el $\geq 50\%$ de los antimicrobianos usados pueden ser innecesarios o inapropiados.^{32, 40, 45, 61}

Dichos datos asociados a la autoprescripción de medicamentos resulta alarmante si consideramos el factor económico, tan solo en México el gasto total en salud del PIB es de 6.3%, según el Informe Salud (México 2004); dicho número ha ido en aumento en los últimos años, cabe destacar que la mitad del gasto corresponde a gasto de bolsillo, del cual el 40% se asigna a la compra de medicamentos, la alta incidencia de autoprescripción, así como los factores demográficos y epidemiológicos hacen que, frente a otros países integrantes de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE),

México se encuentre dentro de los diez con mayor gasto en fármacos con respecto al gasto total en salud (dentro de esta lista se encuentran países como Francia, Hungría, Italia, Japón y Turquía).³⁶

Si tomamos en cuenta todos estos factores, resulta obvio que el costo (tanto humano como económico) en el tratamiento de estos padecimientos aumenta sustancialmente, cayendo en un círculo vicioso, donde el aumento en la autoprescripción incrementa la presión selectiva sobre estos microorganismos tanto patógenos como en aquellos comensales que conviven normalmente en el ambiente intestinal, favoreciendo de esta forma la aparición de organismos resistentes a este tipo de fármacos, lo cual puede en última instancia ocasionar pérdidas humanas y económicas, así como el incremento en la búsqueda de nuevas estrategias para combatir dichas enfermedades, lo que convierte a la resistencia microbiana en un problema de grandes proporciones. No obstante el descubrimiento de nuevos medicamentos hace parecer que estamos un paso adelante de las bacterias; sin embargo, la evolución de las resistencias ha sido más rápida, por lo que la efectividad de un fármaco contra ciertos patógenos específicos se ha ido limitando.

La rápida aparición de cepas bacterianas resistentes a diversos antibióticos es alarmante tanto en los E.E.U.U. como en el resto del mundo, ya que el desarrollo de nuevos antibacterianos es lento,^{57, 71} y aunque actualmente existen múltiples compañías farmacéuticas que trabajan en la búsqueda de nuevos agentes blanco para combatir bacterias multirresistentes, estos aun se mantienen en fase preclínica; de estos agentes pocos han entrado a la fase de desarrollo clínico y tardarán aún de 10 a 15 años para su uso clínico.⁷⁷

No hay duda de que los nuevos antimicrobianos han permitido disminuir la morbilidad y la mortalidad humanas; sin embargo, para maximizar estos beneficios, nos corresponde establecer la vigilancia del uso adecuado de los antimicrobianos y cuidar minuciosamente la forma en que son prescritos.

1. 2 La resistencia a los antibióticos en bacterias.

1.2.1 Tipos de resistencia bacteriana

Los antimicrobianos se pueden categorizar dependiendo de su mecanismo de acción, siendo cuatro los principales: Interferencia en la síntesis de ácidos nucleicos, interferencia con la síntesis de la pared celular, interferencia con la síntesis de proteínas e inhibición de alguna vía metabólica.²⁸

- Interferencia en la síntesis de ácidos nucleicos: Esta interferencia puede ser a nivel del DNA, como es el caso de las fluoroquinolonas, las cuales ocasionan disrupción en la síntesis, causando rompimientos de la doble hebra durante la replicación.²² O a nivel de RNA como es el caso de la rifampicina.²⁸
- Interferencia con la síntesis de la pared celular: El ejemplo más estudiado al respecto es el de los β -lactámicos, los cuales interfieren con proteínas involucradas en la síntesis de la capa de peptidoglicano, siendo representantes de este grupo de

antibióticos las penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactams.⁴⁷ Los glicopéptidos como la vancomicina y la teicoplanina también interfieren en la síntesis de la pared al unirse al extremo terminal de D-alanina de la cadena de peptidoglicano naciente, evitando de esta manera el entrecruzamiento (cross-linking) requerido para la síntesis estable de la pared celular.⁴⁷

- Interferencia de la síntesis de proteínas: Esta interferencia puede ser a nivel de alguna de las subunidades ribosomales, como es el caso de los macrolidos o del cloramfenicol que se unen a la subunidad 50S o las tetraciclinas y los aminoglicosidos que se unen a la 30S. O puede darse a nivel de la sintetasa isoleucil-tRNA sintetasa como ocurre con el caso del mupirocin.²⁸
- Inhibición de alguna vía metabólica: Un ejemplo de estos son las sulfonamidas y el trimetoprim, los cuales bloquean la vía de síntesis de ácido fólico, la cual en última instancia inhibe la síntesis de DNA.

La resistencia a los antibióticos presente en los microorganismos puede ser “intrínseca”, es decir que sea debida a características propias del organismo, o por el contrario puede ser “adquirida”, ya sea por mutaciones de novo en el genoma microbiano o por adquisición de genes de resistencia, pudiendo ser el medio de adquisición la conjugación, transformación o transducción, siendo el vehículo transposones que faciliten la integración de genes de resistencia en el genoma hospedero, o por medio de plásmidos.²⁸

Esta resistencia adquirida puede brindarles la capacidad de producir enzimas que destruyan o metabolicen las drogas antibacterianas, o de expresar sistemas de eflujo (salida) para prevenir que los fármacos alcancen su blanco intracelular.

O puede producir una vía metabólica alternativa que desvíe la acción de la droga, o modificar el sitio blanco (de acción) de la droga.

Así mismo los microorganismos pueden optar por tres estrategias para lidiar con los diferentes agentes antimicrobianos: pueden adquirir genes que codifican para enzimas, como las β -lactamasas, las cuales hidrolizan el enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporánico, produciendo derivados ácidos sin propiedades antibacterianas. De la misma manera, pueden adquirir genes que codifiquen para bombas de eflujo que expulsen el agente antibacterial de la célula antes de que lleguen al sitio blanco y ejerzan su efecto. O pueden adquirir genes para una determinada vía metabólica, la cual en última instancia podría producir una pared celular bacteriana alterada que no contenga sitios de unión para el agente antimicrobiano, o la bacteria puede adquirir mutaciones que limiten el acceso de antimicrobianos al blanco intracelular vía subregulación de genes de porinas.

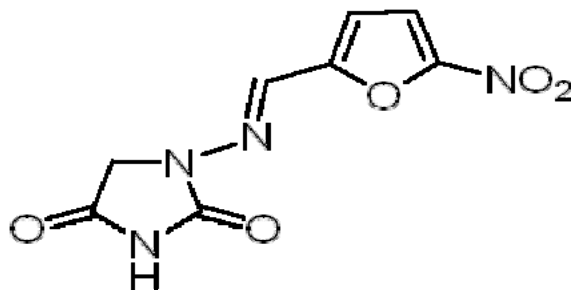
1.2.2 Nitrofurantoína

La nitrofurantoína es un compuesto nitroaromático utilizado como antibiótico en infecciones del tracto urinario bajo, es un antibiótico poco costoso, por lo que su uso es relativamente común en países en desarrollo.³⁹

Su nombre químico es 2,4-Imidazolidinedione, 1-[(5-nitrofurildurideno) amino] hidantoína, forma parte de la familia de los nitrofuranos junto con la furazolidona. Desde el punto de vista de su estructura está formada por un grupo nitro unido a un anillo heterocíclico.⁴⁶ Figura 1.

Se sabe que dicho compuesto es modificado por las nitrorreductasas bacterianas, dando metabolitos que inhiben la síntesis proteica. Las bacterias susceptibles que poseen esas nitrorreductasas, exhiben una relación inversamente proporcional entre los niveles de actividad de éstas y el CMI.¹¹

Nitrofurantoína



PM = 238.16

C₈ H₆ N₄ O₅

Figura 1. Estructura química de la Nitrofurantoína (Cabrerizo et al., 2005)

Existen reportes sobre efectos colaterales provocados por el tratamiento con Nitrofurantoína, algunos ejemplos son enfermedades hepáticas crónicas, hepatitis colestática o anemia hemolítica en pacientes que presentan deficiencia en la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.³⁰ Adicionalmente se ha observado que la nitrofurantoína ocasiona rompimientos de cadena sencilla en el DNA utilizando el test de mutagenicidad de Ames con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100.^{33,75,81} Kari y colaboradores en 1997 demostraron que Nitrofurantoína tiene efectos mutagénicos y carcinogénicos en modelos animales.

1.3 LAS NITRORREDUCTASAS

1.3.1 ¿Qué son las nitrorreductasas?

Las nitrorreductasas o enzimas con actividad nitrorreductasa son un grupo de enzimas que catalizan la reducción del grupo nitro de diversos compuestos nitroaromáticos como algunas flavinas, quinonas, compuestos azo, cromo y algunos compuestos heterocíclicos, valiéndose de la oxidación de NADPH (β-nicotinamida adenindinucleotido fosfato) o NADH (β-nicotinamida adenindinucleotido) como cofactores.⁴⁶

1.3.2 Importancia de las nitrorreductasas

Las nitrorreductasas bacterianas han sido estudiadas debido al interés toxicológico en su participación en la resistencia a nitroimidazol^{60,72,78} por sus usos potenciales en terapia contra el cáncer como activadores de profármacos^{3,42} y en biorremediación de compuestos inorgánicos^{29,69}, ya que se ha reportado que entre la gran variedad de sustratos de las nitrorreductasas se encuentran incluidos diversos contaminantes ambientales, tales como en compuestos explosivos y sus derivados, así como cromo VI²⁶ y compuestos azo, entre los más sobresalientes TNT (2,4,6-trinitrotolueno)^{25,29}.

Dentro del grupo más estudiado de nitrorreductasas (NR) se encuentran las bacterianas, su análisis se ha enfocado en el estudio de su estructura, sus propiedades bioquímicas y moleculares, y su regulación genética.⁶³ McCalla y colaboradores en 1970 y 1978, así como Bryant y colaboradores en 1981 sugirieron mediante análisis bioquímicos con mutantes de *E. coli*, un incremento en la resistencia a antibióticos ligada a mutaciones secuenciales que inactivaban diferentes NR. A partir de estos descubrimientos iniciales se han realizado diversos trabajos sobre metabolismo de NR con diferentes sustratos y se ha especulado sobre la naturaleza de sus sustratos endógenos y su papel fisiológico en el ambiente intracelular.

1.3.3 Clasificación de las nitrorreductasas

Según Paterson y colaboradores (1979), las nitrorreductasas pueden ser clasificadas fundamentalmente en dos tipos busándose en la sensibilidad al oxígeno que presenten dichas enzimas. Se clasifican como nitrorreductasas de tipo I aquellas que son insensibles al oxígeno, mientras que las de tipo II son fuertemente inhibidas por el oxígeno.⁷⁶

Las nitrorreductasas de tipo I se caracterizan porque catalizan la reducción del grupo nitro mediante el paso de dos electrones;^{9,10} dentro de este grupo se encuentran por ejemplo la DT-diaforasa (NAD(P)H-quinona oxidorreductasa), la xantina deshidrogenasa y las nitrorreductasas bacterianas.⁷⁶

En el grupo de las nitrorreductasas bacterianas de tipo II se encuentran la NADPH-citocromo P-450 oxidorreductasa y la NADPH-*b*₅ oxidorreductasa; dichas enzimas se caracterizan porque la catálisis del grupo nitro se efectúa mediante la transferencia de un electrón para llevar a cabo el proceso de reducción, dicho proceso es acompañado de la generación de radicales libres aniónicos.^{20,50} Estos radicales son fácilmente reoxidados en sus compuestos parentales mediante un ciclo redox fútil, para así formar superóxido; por lo cual estas enzimas solo reducen compuestos aromáticos en condiciones de anaerobiosis.⁷⁰

1.3.4 Las nitrorreductasas en *Salmonella enterica*

Dos de las primeras nitrorreductasas bacterianas descubiertas⁴⁶ y más ampliamente estudiadas son la NfsA y la NfsB de *E. coli*, éstas pertenecen a la clase I u oxígeno insensibles; la NfsA con una masa molecular monomérica de 26.8 KDa, posee un grupo prostético Flavin mononucleótido (FMN) y utiliza NADPH como donador de electrones. Bryant y colaboradores en 1981 consideraron a la NfsA como el componente mayoritario en *E. coli*, debido a que su actividad representaba el 80% con respecto a la actividad total

observada, con la cepa silvestre AB1157. El gen *mdaA*, el cual codifica para la NfsA, se encuentra ubicado en el minuto 19.2 del cromosoma de *E. coli*,⁷⁸ y se encuentra flanqueado por *rimK*,⁷ un gen que codifica para una proteína que se encuentra involucrada en la modificación transcripcional de la proteína ribosomal S6,³⁸ y por *ybjC*, un marco de lectura abierto de función desconocida.⁷ Liochev y colaboradores en 1999 encontraron que NfsA y *ybjC* forman un operón regulado por un miembro del regulón *soxRS*, se sabe que dicho regulón se encarga de la regulación positiva de más de 10 genes en respuesta a estrés oxidante; sin embargo la función biológica de las nitrorreductasas aún es desconocida.

La NfsB, también considerada como el componente minoritario responsable de la nitrorreducción por Bryant y colaboradores,⁷¹ es una proteína de aproximadamente 217 aminoácidos⁴⁴ y de un peso molecular aproximado de 24kDa; puede utilizar como donadores de electrones tanto NADH como NADPH, y es codificada por el gen *nfsB*, el cual se encuentra localizado en el minuto 13 en el cromosoma de *E. coli*.^{7,49,71 en 78} *nfsB* está flanqueado por dos marcos de lectura abierta de función desconocida llamados *ybdF* y *ybdJ*. La regulación de este gen se lleva a cabo mediante un elemento involucrado en la subregulación de *marA*, un regulador involucrado en resistencia a múltiples antibióticos y agentes generadores de estrés oxidante.⁵ En el caso de ambas nitrorreductasas, la reducción de los diversos compuestos que pueden emplear como sustrato se lleva a cabo mediante un mecanismo cinético tipo bi-sustrato bi-producto de tipo ping pong (bibipingpong).⁴⁴

Salmonella enterica serovar *typhimurium* posee dos nitrorreductasas de clase I insensibles al oxígeno, SnrA y Cnr las cuales se encuentran presentes en citosol y son codificadas respectivamente por los genes *mdaA* y *nfnB* o *cnr*.¹⁴ Basados en estudios de homología entre las NR de *Salmonella* y *E. coli*, Snr comparte un 87% de identidad con la NR de *E. coli* NfsA, mientras que Cnr comparte un 88.5% con NfsB.^{53,84} Al igual que la NfsA, SnrA es considerada como el componente mayoritario correspondiente a la actividad de nitrorreducción.²⁴ De la misma forma SnrA posee 240 residuos de longitud al igual que NfnA de *E. coli* y tanto su peso molecular como su donador de electrones coinciden con los de su homónima. Lo mismo ocurre en el caso de Cnr y su homóloga en *E. coli* NfsB.

1.3.5 Evidencias de la existencia de la tercera nitrorreductasa

Desde los primeros trabajos efectuados por McCalla y colaboradores se ha reportado la existencia de una actividad de nitrorreducción “residual”, que no corresponde con la actividad de ninguna de las dos nitrorreductasas reportadas hasta el momento en *Escherichia coli K12*.

En 1981 Bryant y colaboradores al estudiar la actividad de nitrorreducción con cepas nitrofurazona resistentes, usando diversos mutantes de *Escherichia coli K12*, encontraron una actividad residual la cual no ha sido genéticamente mapeada.

Así mismo el trabajo de Salamanca-Pinzón y colaboradores (2006) con cepas mutantes de *Salmonella typhimurium* LT2 sugirió la existencia de otra actividad enzimática involucrada en el metabolismo de nitrocompuestos, basándose en la detección de actividad de nitrorreducción en ensayos bioquímicos con extractos celulares de una cepa mutante (RC1517) para ambas nitrorreductasas (SnrA⁻ Cnr⁻). En la figura 2 se observa dicha actividad basal (AB⁻), así mismo se puede observar que la responsable de esta nitrorreducción basal puede hacer uso de ambos donadores de electrones NADH y NADPH.

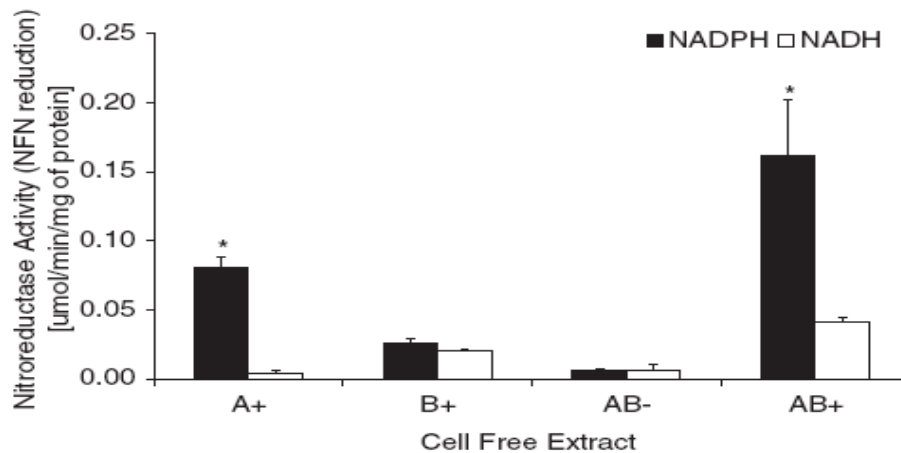


Fig. 1 NRactivity of cell-free extracts from *S. typhimurium* strains Cnr⁻ (A⁺), SnrA⁻ (B⁺), SnrA⁻/Cnr⁻ (AB⁻) and SnrA⁺/Cnr⁺ (AB⁺) with NAD(P)H or NADH as electron donors and NFN as a substrate. Diference between the means calculated using one-way ANOVA and Tukey test. **P* < 0.05.

Figura 2. Actividad de nitrorreducción en cepas mutantes de *Salmonella typhimurium* LT2. NFN (Nitrofurantoína). (Salamanca-Pinzón et al., 2006)

1.4 LOS TRANSPOSONES COMO HERRAMIENTA EN LA INDUCCIÓN DE MUTACIONES.

Los transposones son elementos genéticos móviles capaces de cambiar de lugar en el genoma, estos fragmentos de DNA, descubiertos por primera vez por Bárbara McClintock en 1948 al estudiar la planta del maíz (*Zea mays*), se encuentran distribuidos ampliamente en todos los taxones y constituyen una fuente de variación genética lateral. Se sabe que la inserción de dichos elementos puede ocasionar alteraciones en la regulación y expresión genética, así como ocasionar mutagénesis a gran escala en el genoma hospedero.³⁷

Dichos elementos pueden agruparse en dos clases; la clase I la constituyen elementos que utilizan la reverso transcriptasa para transponerse por medio de una molécula de RNA intermediario, encontrándose dentro de este grupo los elementos *Alu* en primates, los IAP's (intra-cisternal A particles) en roedores, los elementos *Ty* en levaduras y los elementos *gypsy* y *copia-like* de *Drosophila*.

Dentro de la clase II se encuentran los elementos-*P* de *Drosophila*, la superfamilia *Tc-I/mariner*, los elementos Mutadores (Mu) pertenecientes a virus lambdoides, los elementos Activador y Supresor-mutador en maíz y los elementos Tn en bacterias. Los elementos de clase II se caracterizan por una transposición de DNA a DNA, mediante el uso de secuencias repetidas invertidas en sus terminales llamadas secuencias de inserción, y la formación del transpososoma³⁴ (un complejo de transposición DNA-transposasa-

nucleoproteínas), cuya principal característica es la transposasa codificada por el mismo transposon.²⁹

Desde el descubrimiento de los elementos transponibles, su estudio y la identificación de sus mecanismos de virulencia e infección han dado la pauta para el desarrollo de numerosas estrategias para el estudio genético y su uso como herramientas, debido a sus cualidades. Los transposones pueden ser utilizados para crear interrupciones genéticas, estudiar genes relacionados con virulencia bacteriana mediante mutagénesis por inserción y realizar el mapeo genético clásico.⁸

1.4.1 El Transposón Tn10

El transposón Tn10 ha sido ampliamente estudiado y utilizado como una herramienta genética en bacterias. Este transposón se caracteriza por presentar una estructura modular constituida por una región central, la cual codifica para la resistencia a tetraciclina y una flanqueante que codifica para las funciones catalíticas (transposasa). Esta región central se encuentra flanqueada por los extremos IS (Secuencias de inserción), las cuales son secuencias repetidas invertidas, que juegan un papel importante en el proceso de transposición, puesto que es el sitio de reconocimiento de la transposasa para la formación del transpososoma y su posterior movilización hacia un sitio diferente del genoma hospedero.⁸

Tn10 es un transposón de 9.3 kpb de longitud y las secuencias de inserción IS10 de \pm 1300pb de longitud con 22pb invertidas repetidas en sus terminales en las cuales se lleva a cabo el corte y/o unión entre las cadenas del transposón y el DNA hospedero.⁸

1.4.2 El elemento Mu

Mu, es un bacteriófago lambdoide temperado que usa la transposición como un mecanismo normal para promover la replicación, posee un genoma de 38kpb de longitud. Posee una estructura modular constituida en su parte central por los genes MuA y MuB, los cuales se requieren como mediadores de la transposición; MuA codifica para la transposasa de Mu, mientras que MuB codifican una pequeña proteína que está involucrada en interacciones con el DNA hospedero. Otro constituyente de la parte central puede ser la resistencia a algunos antibióticos, la cual es una característica de algunas moléculas víricas modificadas, utilizadas como herramientas genéticas.⁸

En sus extremos se encuentra flanqueado por dos secuencias terminales llamadas MuL, la cual se encuentra en el extremo terminal izquierdo, y MuR, en el extremo derecho, dichas secuencias juegan un papel predominante en la formación del transpososoma y la posterior transposición del elemento.³⁴

1.5 ELECTROFORESIS DE GRADIENTE DE CAMPO PULSADO COMO HERRAMIENTA DE MAPEO DE MUTACIONES EN *Salmonella enterica*

La electroforesis de campo pulsado (PFGE) es una técnica electroforética diseñada en 1984 por Schwartz y Cantor la cual se basa en la emisión de pulsos inversos que modifican la dirección del DNA que migra a través de una matriz de agarosa o poliacrilamida.¹ A diferencia de una electroforesis convencional en la cual los fragmentos de DNA superiores a 25kb migran esencialmente juntos de manera independiente de su tamaño, la electroforesis de campo pulsado permite la separación de fragmentos de DNA de tamaños superiores, en un rango de 30-50kb a 10Mb.⁶

Al forzar al DNA a cambiar de dirección mediante la emisión de un pulso reverso, los fragmentos de diferentes tamaños se separan unos de los otros, de tal forma que con cada nueva emisión de los pulsos se lleva a cabo la reorientación de los fragmentos de ADN, de tal forma que los fragmentos de menor tamaño se reorientarán con una mayor velocidad que los fragmentos de tamaños superiores, separándose y migrando conforme a su peso.⁶

A partir de 1984 se han desarrollado diversos sistemas de electroforesis de campo pulsado, con el fin de separar las moléculas de DNA cuyo tamaño sea superior a 30kb, basados en la emisión de pulsos con diferentes geometrías que permitan la reorientación diferencial de las moléculas de DNA que migran a través de una malla de agarosa o polyacrylamida.⁷³ Basados en el ángulo de orientación del campo de emisión las electroforesis de campo pulsado pueden dividirse en dos tipos: aquellos que se basan en una inversión de polaridad periódica de los electrodos durante la electroforesis convencional, con lo cual se logra una reorientación de 180° con un desplazamiento del DNA únicamente en sentido vertical u horizontal. El segundo tipo corresponde a electroforesis de campo pulsado en la cual se emplean ángulos entre 96° y 120° lo cual permite el desplazamiento del DNA en patrón de zigzag.⁶

Actualmente existen una gran cantidad de aplicaciones para el PFGE, las cuales incluyen su uso para genotipificación, la clonación de grandes fragmentos de DNA vegetal mediante cromosomas artificiales de levadura (YAC's) y vectores de clonación²³, identificación de fragmentos de restricción en polimorfismos (RFLP's) y la construcción de mapas físicos genéticos, detección de rompimiento y degradación de cromosomas in vivo²³ y determinación de cariotipo electroforético¹ son algunas de sus aplicaciones.

2. OBJETIVO GENERAL

Describir mecanismos de resistencia a la nitrofurantoína en *Salmonella typhimurium* LT2 alternos a las mutaciones en los genes *mdaA* y *nfnB*.

3. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Construcción, aislamiento y clasificación de cepas resistentes a nitrofurantoína a través de inserciones del elemento Mud-Cam en *Salmonella typhimurium* LT2.
2. Mapeo de las inserciones Mud-Cam aleatorias que confieran el fenotipo de resistencia a nitrofurantoína.
3. Caracterización de los genes relacionados con el fenotipo de resistencia a nitrofurantoína en cepas de *Salmonella typhimurium* LT2 que presentan las inserciones Mud-Cam.
4. Construcción de un interposón portador de sitios XbaI que facilite el mapeo de las inserciones Mud-Cam mediante sustitución del elemento.

4. HIPOTESIS

Debido a que existe una actividad de nitrorreducción residual independiente de *SnrA* y de *Cnr*, y que se desconocen los mecanismos de transporte y permeabilidad celular a la nitrofurantoína, es posible la existencia de mecanismos independientes de los genes *mdaA* y *nfnB* que confieren resistencia a la nitrofurantoína en *Salmonella enterica*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS RC1484-RC1502 y RC1504-RC1507.

5.1.1 Inducción de mutaciones mediante transducción.

Para la mutagénesis por inserción del elemento Mud-Cam se empleó la cepa RC694, la cual porta una inserción de dos elementos Mu: la primer inserción se localiza en el gen *hisA9941::Mud-1* y la segunda en el gen *hisD9953::Mud-Cam*. La segunda inserción porta la resistencia a cloramfenicol mientras que la primer inserción confiere resistencia a ampicilina y posee los genes *MuA* y *MuB* que codifican para la transposasa; la distancia entre las dos inserciones es suficientemente grande para impedir que los dos elementos móviles puedan ser transducidos simultáneamente por una misma partícula transductante P22, pero suficientemente cercanos para que la partícula transductante de Mud-Cam pueda llevarse un fragmento de Mud-1 conteniendo la transposasa. La transducción provee de la transposasa para que se genere la movilidad de Mud-Cam con la expresión transitoria de la transposasa previa a la degradación del fragmento transducido. La cepa receptora fue RC516, *Salmonella* con una delección del operón de histidina donde *hisA* y *hisD* no están presentes, por lo que no existe homología en la cual se pudiera recombinar Mud-Cam, forzando los eventos de transposición. Es importante señalar que el crecimiento de la cepa RC694 y la propagación de P22 en ella deben realizarse a no más de 30°C para evitar que el represor MuC^{ts} de Mu-1 se inactive y se den eventos de transposición de este elemento. Se aislaron 100,000 colonias independientes Cm^R que se agruparon (pool) y en ellas se creció P22; esta propagación se llamó Mud-Cam pool y representa los 100,000 eventos de inserción por transposición, con esta propagación se transdujo en RC1 *Salmonella enterica* silvestre (wild type oWT) seleccionando para Cm^R , en este caso la resistencia se debe a la inserción presente de Mud-Cam sin que medie evento de transposición sino solo por la inserción en RC1 por recombinación homóloga. Posteriormente por réplica de placa se verificó en los candidatos la presencia de Nf^R . La cepa empleada de P22 es la HT105/1, un mutante que en lugar de producir 5% de partículas transductantes, genera el 50%, por lo que la eficiencia de transducción es elevada.

5.1.2 Selección de bacterias transductantes

La selección de las transductantes con el elemento Mud-Cam se llevó a cabo en placas de medio NB con 20 μgml^{-1} de cloramfenicol. Posteriormente se realizó réplica de placa (replica printing) de las transductantes, en placas de NB 20 μgml^{-1} con Nitrofurantoína. El criterio de exclusión se limitó a considerar candidatos a aquellas cepas $Cm^R Nf^R$ que en la réplica de placa a Nf^R presentaran múltiples colonias pequeñas en la huella de la colonia Cm^R ; la idea detrás de esta observación es que si se trata de mutaciones espontáneas Nf^R , estas deben ser en pocas células de la colonia original Cm^R no expuesta a Nf por lo que su replica generaría una sola colonia o doble Nf^R , pero si la resistencia es de toda la colonia

por la inserción del elemento móvil, todas las células de la colonia deben compartir esta característica, por lo que al realizar la réplica de placa con los hilos del terciopelo, es de esperar multitud de células transportadas en la réplica por colonia, dando origen a micro colonias en cada candidato Nf^R . Solo colonias con este fenotipo fueron recolectadas.

5.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración del antimicrobiano (en $\mu\text{g/mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C . El CMI se ha establecido como un buen indicador frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad a los antibióticos; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado.²

En el presente trabajo se evaluó el CMI de las cepas RC1484-1502 y RC 1504-1507 a partir de un cultivo bacteriano de $\approx 10^8$ células por mililitro, se realizó diluciones de un factor de 10^{-6} , de esta dilución se tomaron $20\mu\text{l}$, conteniendo aproximadamente ≈ 20 células, las cuales se espatularon en medio NB en presencia de concentraciones de Nitrofurantoína de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20, $25\mu\text{gml}^{-1}$.

El experimento se realizó en condiciones de aerobiosis y el análisis de los resultados se llevó a cabo a las 24 horas. Posteriormente se realizó un segundo experimento en condiciones de anaerobiosis a una concentración parcial de O_2 de 0.5ppm. Los resultados fueron obtenidos a las 48 horas.

Los experimentos se realizaron por duplicado. Se consideró como CMI aquellas placas en las que la inhibición del crecimiento bacteriano fue del 100%.

5.3 AISLAMIENTO Y CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS OBTENIDAS.

Las cepas construidas vía transducción fueron tomadas a partir de una colonia aislada y se crecieron en placas con medio verde a fin de purificarlas y seleccionarlas como libres de fago. Se seleccionaron colonias claras (sin fago) y posteriormente se llevó a cabo su resiembra en medio verde cruzando con el fago H5 no lisógeno (sensibilidad a infección por nuevo fago) a fin de que fuesen viables para una nueva infección y su posterior transducción.

5.4 MAPEO

5.4.1 TRANSDUCCIÓN DE CEPAS PARA CÁLCULO DE DISTANCIA ENTRE ELEMENTOS POR COEFICIENTES DE COTRANSDUCCIÓN

Se realizó una transducción entre las cepas candidato RC1584-1502 y RC1504-1507 con fagos P22 pool ($\Phi\text{Pool RC69/RC302}$), seleccionando a las transductantes en placas de NB con $20\mu\text{gml}^{-1}$ de tetraciclina y posteriormente se realizó la replica de placa en cajas con $20\mu\text{gml}^{-1}$ de cloramfenicol y $20\mu\text{gml}^{-1}$ de tetraciclina seleccionando colonias aisladas cuyo fenotipo fuera Cm^STc^R . Las cepas fueron purificadas de fago y almacenadas bajo los nombres de H9, V5 y V9.

Posteriormente se extrajo fago de los candidatos obtenidos (mediante infección con partículas de HT105/1) y se realizó una transducción con la cepa parental correspondiente a cada candidato. La selección de las cepas resultantes se llevó a cabo en placas de NB con $20\mu\text{gml}^{-1}$ de tetraciclina. De igual forma se realizó replica de placa en cajas petri con medio NB con $20\mu\text{gml}^{-1}$ de tetraciclina y $20\mu\text{gml}^{-1}$ de cloramfenicol. Se seleccionaron aquellas transductantes cuyo fenotipo correspondiera a $\text{Tc}^{\text{R}} \text{Cm}^{\text{R}}$ conteniendo de esta forma ambos elementos en su genoma.

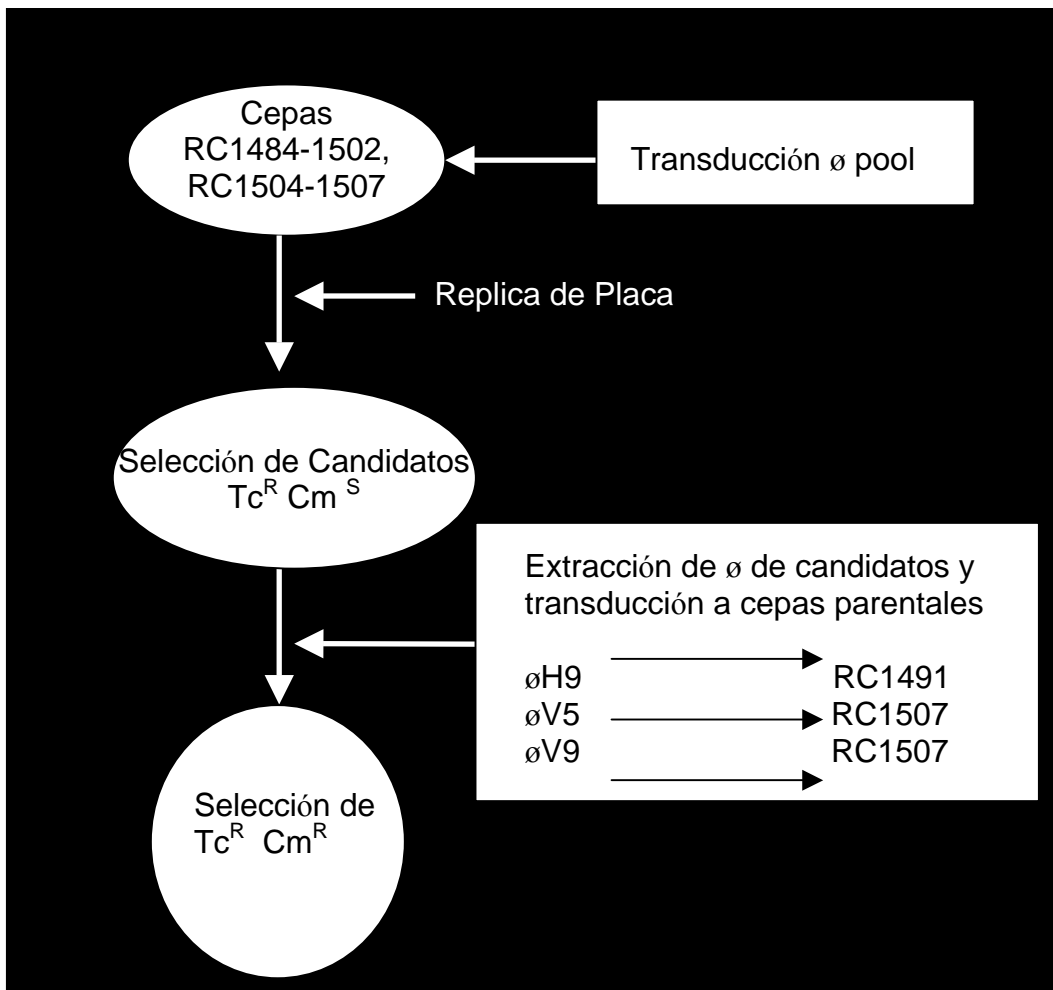


Figura 3. Diagrama de flujo para obtención de cepas candidato para cálculo de distancia entre elementos por frecuencia de cotransducción.

De las cepas obtenidas se eligieron tres al azar, f1 (derivada de la cepa H9), d5 (derivada de la cepa V5) y e10 (derivada de la cepa V9). Se extrajo fago de dichas cepas y se transdujeron con cepas WT RC1.

La selección se realizó en dos grupos, denominados A (selección de transductantes en placas con medio NB y $20\mu\text{gml}^{-1}$ de tetraciclina) y B (selección de transductantes en cajas petri con medio NB y $20\mu\text{gml}^{-1}$ de cloramfenicol) para cada cepa candidato transducida con la cepa WT RC1.

Posteriormente se realizó replica de placa de cada cepa y grupo, en placas de NB con $20\mu\text{gml}^{-1}$ de tetraciclina y $20\mu\text{gml}^{-1}$ de cloramfenicol y se contabilizaron los resultados.

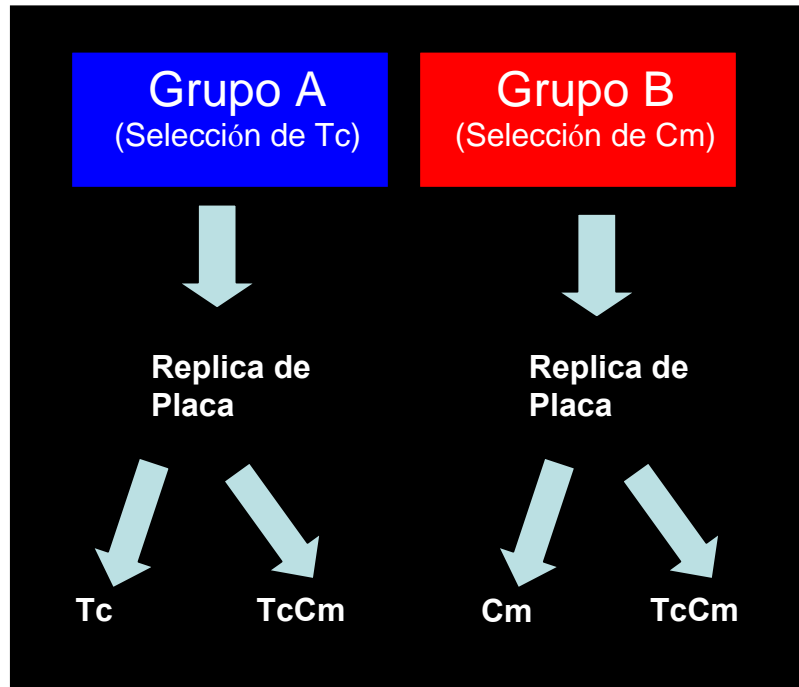


Figura 4. Diagrama de flujo para obtención de cepas candidato para cálculo de distancia entre elementos por frecuencia de cotransducción.

5.4.2 COEFICIENTES DE COTRANSDUCCIÓN

A través del análisis de frecuencia de cotransducción puede obtenerse un aproximado de la distancia entre dos marcadores ubicados bajo un contexto genético común. Según la fórmula descrita por Wu en 1966 “las frecuencias de cotransducción son una función de la distancia entre marcadores en minutos de DNA empacado.”^{12, 16} Siendo su fórmula descrita como: $100/C=1+[(k-m)^3 - (k-m-s)^3]/(k-m-n-s)^3$. Donde k es el tamaño de partícula transducida, m es el tamaño del marcador donado en kpb, C es el porcentaje de cotransducción entre los elementos analizados, n el tamaño del marcador no seleccionado en kpb y s la distancia entre los marcadores en kpb.¹⁶

5.4.3 PFGE

Se emplearon las cepas RC1 (WT), la cepa d5 (derivada de la cepa RC1507), la cepa e10 (otra cepa derivada de la cepa RC1507) y la cepa f1 (derivada de la cepa RC1491). Se partió de colonias únicas, las cuales se crecieron en medio NB con $20\mu\text{gml}^{-1}$ de cloramfenicol y $20\mu\text{gml}^{-1}$ de tetraciclina.

La extracción del DNA de las cepas en cuestión se llevó a cabo dentro de plugs de agarosa según el protocolo de Shu-Lin Liu y Kenneth E. Sanderson (1995). Los plugs fueron digeridos con 0.6 unidades de XbaI, se dejaron incubar toda la noche a 37°C y posteriormente se detuvo la digestión añadiendo 5µl de EDTA 0.5M.

El DNA de las cepas embebidas en los plugs de agarosa se corrieron en geles de agarosa para PFGE Bio-Rad® (Certified Megabase Agarose) al 1%, con buffer TBE 0.5X, en la cámara de electroforesis de campo pulsado CHEF (Contour-clamped homogeneous electric field; Chu, et al., 1986, 1990) de Bio-Rad®.

El sistema CHEF posee como característica el mantener un campo eléctrico homogéneo en combinación con un gel horizontal, en el cual se cambia la dirección del campo eléctrico para producir la reorientación del DNA al cambiar la polaridad de un arreglo de electrodos. En este sistema, resulta fundamental tomar en cuenta varios factores que determinan el resultado de la electroforesis, el primero es la fuerza del campo eléctrico, el cual se expresa en Volts por centímetro (V/cm), esta determina en combinación con el tiempo, la resolución de las bandas de un tamaño en particular, obtenidas en la electroforesis de campo pulsado. El intervalo de tiempo (dado en segundos) entre los pulsos determina el rango de separación, es decir, pulsos con intervalos mas largos pueden servir para separar grandes fragmentos de DNA. El ángulo de reorientación (dado en grados, con un máximo de 120° para CHEF) determina el equivalente a la separación que se requiere, es decir, para definir las bandas más pesadas de DNA se requiere utilizar ángulos de entre 96° y 165°, mientras que para definir las bandas de DNA mas pequeñas o ligeras se requieren ángulos pequeños de entre 96° y 105°. Finalmente la temperatura necesita ser constante, por lo que al prolongarse las corridas, en ocasiones a más de 12 horas, es necesaria una circulación del buffer, junto con un sistema de enfriamiento con el cual cuenta el equipo.

El programa de Electroforesis de campo pulsado fue el siguiente:

Temperatura: 14°C	Voltaje	Angulo de emisión del pulso	Duración del pulso		Duración de programa de pulsos
			Inicial	Final	
Programa 1	4.6V/cm ²	120°	60 seg	60 seg	16 horas
Programa 2	4.6V/cm ²	120°	10 seg	20 seg	16 horas

Circulación de Buffer: 75 L/min

Se usó el patrón de restricción de la cepa silvestre cortada con XbaI como marcador de peso molecular y patrón de referencia, para distinguir la aparición y desaparición de bandas, las cuales indicarían el sitio de corte adicional proporcionado por la inserción del transposón Tn10d-tet, cercano a la inserción del elemento Mud-Cam. (Figura 5)

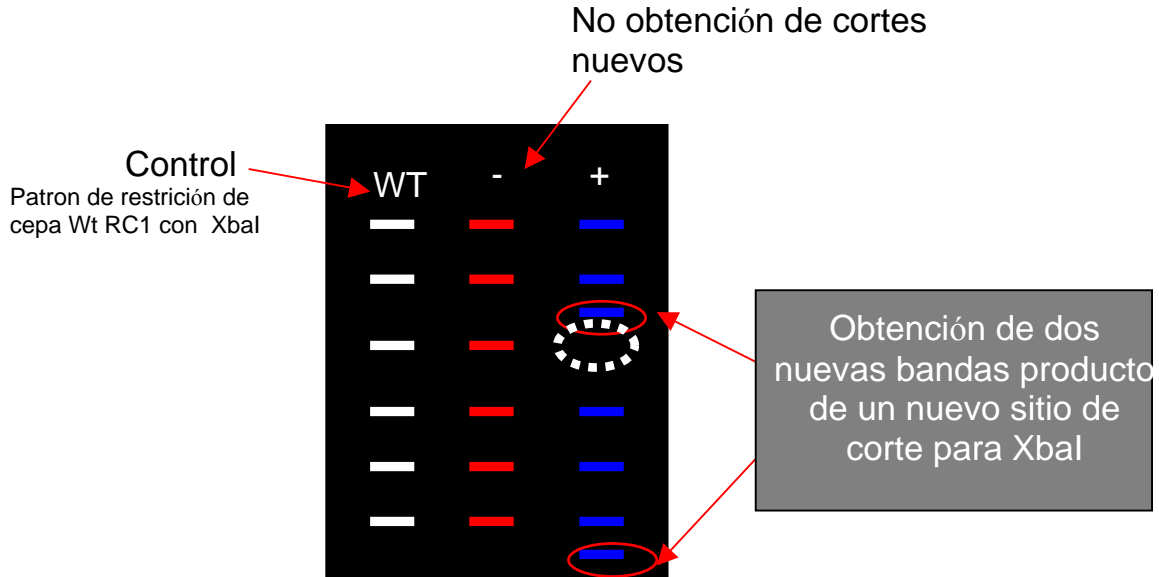


Figura 5. En la figura se esquematiza un gel de PFGE, en el cual se usa a la cepa RC1 WT como control y se muestra como en la cepa marcada como - (menos), no se observa la visualización de nuevas bandas, mientras que en la cepa marcada como + (mas), se observa la desaparición de una banda (círculo punteado) y la aparición de dos nuevas bandas (círculos rojos)

Finalmente los gels fueron teñidos con una solución de $0.5\mu\text{gml}^{-1}$ de bromuro de etidio Sigma®. Las bandas fueron visualizadas con luz UV utilizando un transiluminador (BioRad®).

5.4.4 PCR SEMIALEATORIO

La técnica de PCR semialeatorio es una variante del PCR original, este fue diseñado por Chun y colaboradores en 1997 y consiste de dos reacciones de PCR en las cuales se emplean dos diferentes tipos de oligonucleótido de acuerdo con su especificidad. Los oligonucleótidos específicos diseñados para una secuencia conocida y los oligonucleótidos de unión semialeatoria. En la primera fase se emplean oligonucleótidos diseñados con base en una secuencia conocida, en este caso, las secuencias de los extremos del elemento Mud-Cam, junto con una colección de oligonucleótidos que se alinean de forma semiespecífica en las regiones circundantes al sitio de inserción del elemento, es decir las secuencias que se desconocen. Estos oligonucleótidos de unión aleatoria o degenerados constan de tres partes importantes; la primera, una secuencia de unión aleatoria conformada por cuatro bases (CGAC) y una quinta base que cambia según el oligonucleótido, para el oligonucleótido ORC 6, la secuencia es CGACG, para ORC 7 es CGACA, para ORC 8 corresponde a CGACC, y para ORC 9 CGACT. La parte media del oligonucleótido corresponde a una secuencia de 10 bases desconocidas (10 N's). Finalmente la última parte corresponde a la secuencia P (ACTTCTCAACA ACTCAGGACGAACA), esta secuencia es específica del oligonucleótido y no se encuentra en el genoma de la bacteria, su función es la de servir

como un selector para la reamplificación y descartar de esta forma autoamplificaciones. (Ver figura 6 y tabla 10 de resultados).

De esta forma al usar combinaciones de un oligonucleótido de anclaje a uno de los extremos del elemento Mud-Cam y otro que posea una secuencia con la que es capaz de alinearse de manera semiespecífica, en condiciones de baja astringencia, se amplía la posibilidad de amplificar la zona intermedia a la inserción. Finalmente al utilizar como templado para la segunda reacción el producto obtenido de la primera PCR, puede descartarse autoamplificaciones o amplificaciones inespecíficas y con ello secuenciar, ubicando rápidamente el sitio de inserción del transposón con base en el contexto que le rodea.

Oligonucleótidos de PCR semialeatorio

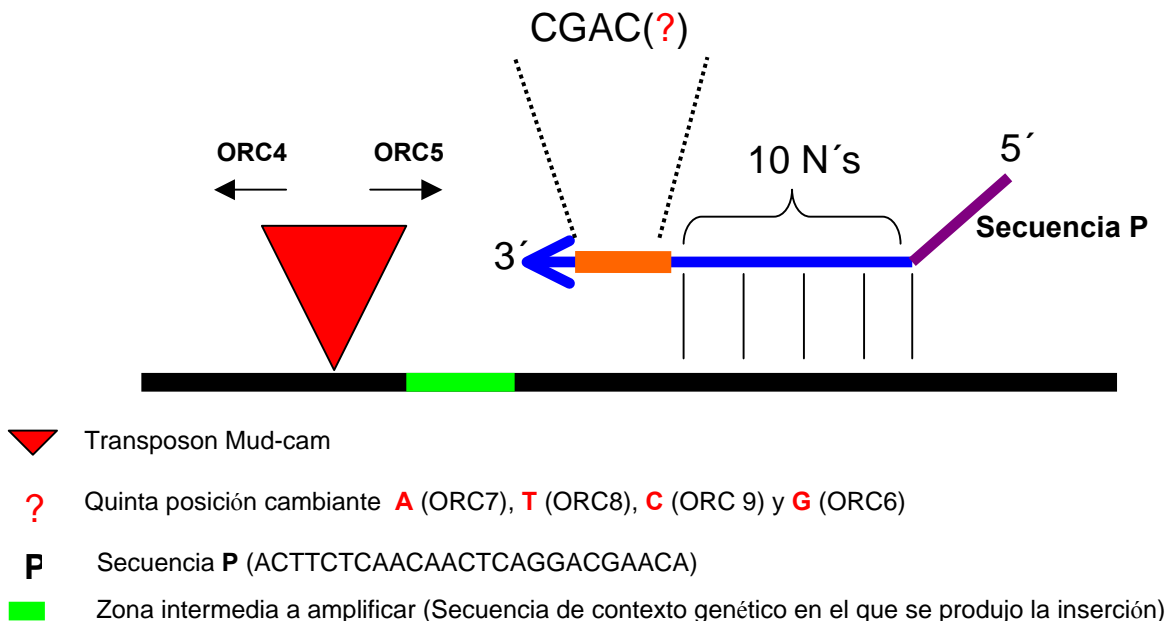


Figura 6. Los oligonucleótidos ORC 4 y ORC 5 se anclan a la secuencia correspondiente a los extremos izquierdo (ORC 4) y derecho (ORC 5) del elemento Mud-Cam. A la derecha se muestra el diseño de los oligonucleótidos degenerados o de unión aleatoria, los cuales contienen una secuencia de cinco bases (en color naranja), en la cual, la quinta posición varía para cada uno de los cuatro oligonucleótidos utilizados. Esta parte es la encargada de brindar la unión aleatoria en el genoma bacteriano. Posterior a estas bases, hay una región (azul) conformada de 10 bases desconocidas (10 N's). El componente final de estos oligonucleótidos es la secuencia P (morado).

5.4.4.1 Cepas

Se extrajo el DNA de las cepas RC1484, RC1487, RC1488, RC1491, RC1493, RC1494, RC1497, RC1498, RC1499 y RC1500. La extracción se llevó a cabo de cultivos iniciados a partir de colonias independientes, las cuales se crecieron en medio NB con cloramfenicol $20\mu\text{g ml}^{-1}$, la extracción se realizó mediante el protocolo descrito por Sambrook et. al. en 1989 y se almacenó el DNA a -20°C

5.4.4.2 Condiciones de corrida

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Idaho Technologies®, bajo las siguientes condiciones.

Desnaturalización inicial a 94°C por 30 segundos; 5 ciclos caracterizados por una etapa de desnaturalización a 94°C por 5 segundos, alineamiento a 45°C por 20 segundos y una etapa final de polimerización a 72°C por 1 minuto, con un slope (pendiente de exigencia) de 4.0. Una segunda etapa caracterizada por 30 ciclos con una etapa de polimerización a 72°C por 1 minuto, con un slope de 9.9. Finalmente una etapa de polimerización a 72°C por 5 minutos.

La segunda reacción de PCR fue idéntica a la primera, exceptuando que el slope de ambas etapas fue de 9.9.

5.4.4.3 Mezclas de reacción

Las mezclas para las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes finales de $10\mu\text{l}$, conteniendo 2mM de MgCl_2 , 10ng de DNA genómico bacteriano, 10pmol de cada oligonucleótido y 0.25mM de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfatados. Al final se agregó la Taq DNA polimerasa Promega® junto con el anticuerpo AntiTaq ClonTech®, el cual inactiva a la Taq DNA polimerasa hasta el momento de la amplificación, en la cual se separa de ésta al ser sometida a temperaturas de 72°C , dejando libre a la Taq DNA polimerasa, permitiendo así la extensión de la cadena.

5.4.4.4 Geles

Las muestras amplificadas por PCR se corrieron en geles de agarosa Sigma® al 1%, con buffer TAE, durante 50 minutos a 100 Volts. Posteriormente los geles fueron teñidos con una solución de $0.5\mu\text{gml}^{-1}$ de bromuro de etidio Sigma®. Las bandas fueron visualizadas con luz UV utilizando un transiluminador (BioRad®).

5.4.4.5 Combinaciones de oligonucleótidos

Se realizaron combinaciones de oligonucleótidos para lograr la amplificación, estas estuvieron integradas por el oligonucleótido 1 (específico de unión a uno de los extremos

Figura 7. En la imagen se muestra un diagrama de flujo con los pasos realizados para el procedimiento de PCR semialeatorio. En los cuadros azules se muestran las combinaciones de oligonucleótidos analizadas en el trabajo.

La banda seleccionada como candidato para reamplificación se extrajo, utilizando un capilar de cristal con capacidad de 50µl y se embebió en 50 µl de Agua MilliQ filtrada y estéril, y se guardó a 4°C durante toda la noche.

5.4.5 PRUEBA DE DEPENDENCIA

La prueba de dependencia se basa en el anclaje del transposón específico para el elemento Mud-Cam y el oligonucleótido P (ORC 10), dicho oligonucleótido está diseñado para reconocer la secuencia P de los oligonucleótidos degenerados (o de unión semialeatoria), por lo que esta segunda amplificación es específica y solo puede obtenerse cuando se encuentran ambos oligonucleótidos en la reacción; este último punto sirve como criterio de descarte de autoamplificaciones.

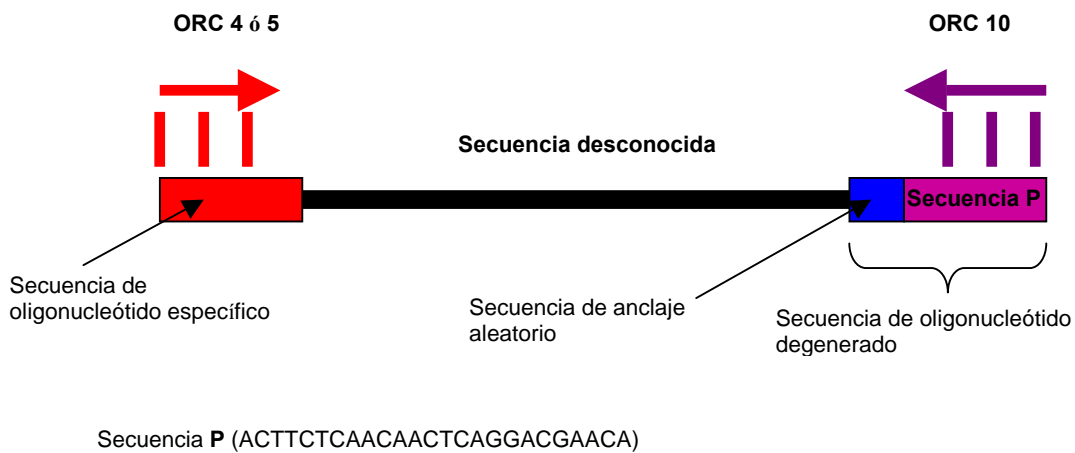


Figura 8. En esta imagen se muestra un esquema de la reamplificación de los candidatos obtenidos en la primera fase del PCR semialeatorio.

El sobrenadante de la banda candidato embebida en agua, sirve a manera de templado para la reamplificación. Esta reamplificación se lleva a cabo usando el oligonucleótido específico del elemento Mud-Cam con el que se haya obtenido la amplificación inicial (combinación correspondiente al candidato) y el ORC 10 específico para la secuencia P (en lugar del oligonucleótido degenerado). Para poder descartar la amplificación de interés de aquellas correspondientes a otros sitios del genoma, producto del anclaje de dos oligonucleótidos degenerados, o producto de autoamplificación de oligonucleótidos. Figura 8

Para esto se realizaron cuatro mix de amplificación. El primero contenía todos los elementos de la reacción de PCR a excepción del templado, por lo que con este ensayo pueden descartarse contaminación y autoamplificación entre los oligonucleótidos.

El segundo contenía de igualmente todos los componentes excepto el oligonucleótido 1, es decir el oligo específico para el elemento Mud-Cam; de esta forma pueden descartarse amplificaciones inespecíficas ocasionadas por el anclaje entre dos oligonucleótidos degenerados.

En el tercero, al igual que el segundo, se omitió uno de los oligos, solo que en esta ocasión fue el oligonucleótido 2, es decir ORC 10, con esta prueba se descartaron posibles autoamplificaciones entre los oligonucleótidos específicos para Mud-Cam, obtenidos por las bajas condiciones de astringencia en las que se llevó a cabo la primera amplificación.

Finalmente en el cuarto mix se incluyeron todos los componentes sin ninguna excepción.

El criterio de descarte se basó en que solo fueron seleccionadas las amplificaciones que únicamente se obtuvieron en presencia de todos los componentes de la mezcla de reacción para PCR, es decir aquellos que fueran dependientes de ambos oligonucleótidos, descartándose los candidatos cuyas bandas obtenidas se encontraran en los tres casos antes mencionados (es decir, aquellos que no eran dependientes de la presencia de los dos oligonucleótidos para la amplificación). Figura 9

Finalmente se incluyó como control positivo la amplificación de amiA, usando los oligonucleótidos correspondientes (ver tabla 10 de resultados), como control general de la mezcla de amplificación de PCR.

5.5 CONSTRUCCIÓN DE UN INTERPOSÓN

La finalidad de construir un interposón parte de la necesidad de construir una herramienta que permitiera transformar las cepas que tuviesen integrado un elemento Mud-Cam y que con ello fuesen resistentes al antibiótico cloramfenicol, en cepas resistentes al antibiótico tetraciclina. El gen de resistencia a tetraciclina posee un sitio de corte para la enzima de restricción XbaI, la cual posee relativamente pocos sitios de corte en el genoma de *Salmonella typhimurium* (27 sitios de corte). Puesto que el método de electroforesis de campo pulsado (PFGE) nos permite el análisis físico de genomas bacterianos completos, al contar con la posición de los sitios de corte de la enzima, es posible el utilizar esta herramienta para obtener un mapeo físico del sitio de inserción de los transposones, de una manera mas directa y con una mayor rapidez. Figura 10

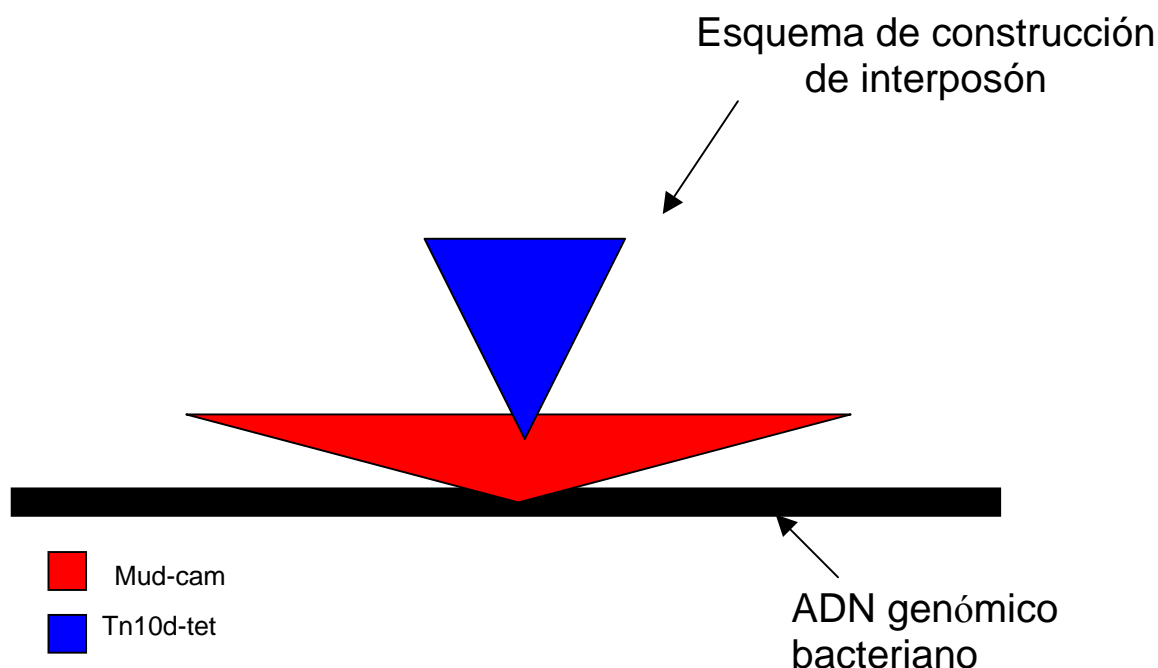


Figura 10. En esta figura se esquematiza la construcción del interposón, el cual consiste en un elemento Mud-Cam inserto en el genoma bacteriano, y a su vez un elemento Tn10d-tet inserto en la secuencia del elemento Mud-Cam, interrumpiendo de esta forma la expresión de la resistencia a cloramfenicol (es decir cloramfenicol sensible, tetraciclina resistente).

Tabla 1. Cepas utilizadas en la construcción del interposón

Cepa	Genotipo	Construcción
RC688	sty(LT2) strA1 nadA379::Tn10d-tet / F'152 nadA+ Mud-Cam	Transducción
RC 307	sty(LT2) metE205 DEL299(hisG, phs, cobI II III) / pNK2881 ap-Resistant, tnp mutant	Transducción
RC1048	sty(LT2) his-644(del:OGDCBHAF) pro-621 / F'128 pro+ lacZ3113::Tn10d-tet	Transducción
RC1585*	sty(LT2) metE205 DEL299(hisG, phs, cobI II III) / pNK2881 F'152 nadA+ Mud-Cam	Conjugación
CB3*	sty(LT2) metE205 DEL299(hisG, phs, cobI II III) / F'152 nadA+ Mud-Cam	Replica de Placa
RC456	sty(LT2) nadA213::Tn10 / F'152 nadA+ zzf-1878::MudF	Conjugación

* Cepas construidas en el presente trabajo

La construcción de dicha herramienta se llevó a cabo en un elemento extracromosómico, en este caso un plásmido. Las cepas elegidas para este fin son la cepa RC688, la cual posee un elemento Mud-Cam inserto en el plásmido F'152; y la cepa RC1048, la cual posee un transposón de la familia Tn10, deficiente en transposasa y asociado a la resistencia de interés (es decir tetraciclina), el transposón Tn10d-tet ubicado en el plásmido F'128.

5.5.1 CONSTRUCCIÓN DE LA CEPA 1585

El primer paso para la construcción del interposón, fue la construcción de una cepa que contuviese el transposón Mud-Cam en un elemento extracromosómico (en este caso un plásmido F') y que además expresara la transposasa para derivados Tn10d, necesaria para poder movilizar los elementos mediante transposición. Para lo cual se utilizaron las cepas RC688 la cual posee una inserción Mud-Cam en el plásmido F'152 y la cepa RC307 la cual cuenta con el plásmido pNK2881 el cual contiene una transposasa mutante con menor especificidad por el sustrato recombinogénico, la cual permite mayor aleatoriedad en la inserción que la transposasa silvestre.^{41,62} La primer cepa es resistente a cloramfenicol 20µgml⁻¹ mientras que la segunda cepa resiste 200µgml⁻¹ de ampicilina, con lo que es posible el seguimiento de las construcciones.

Para esto, se partió de colonias únicas, las cuales fueron crecidas en medio NB líquido con el antibiótico correspondiente, luego de la inoculación de los tubos que contenían el medio con el antibiótico, cada tubo fue incubado a 37°C con agitación de 100rpm. Se realizaron lecturas en un espectrofotómetro cada hora, para medir el crecimiento de cada cepa hasta alcanzar la fase exponencial del cultivo a una densidad óptica de 600nm (fase en la cual las cepas son más sensibles a conjugación). Una vez que esta fase fue alcanzada, se tomó una alícuota de 200µl de la cepa RC688 y 200µl de la cepa RC307 y se colocaron juntas en un tubo eppendorf, el cual se incubó a 37°C sin movimiento durante toda la noche. Finalmente las exconjugantes se sembraron en medio NB sólido, en presencia de ambos antibióticos (cloramfenicol y ampicilina).

5.5.2 TRANSDUCCIÓN ENTRE LA CEPA RC1585 Y RC1048

El siguiente paso en la construcción del interposón consistió en movilizar el transposón Tn10d-tet ubicado en el plasmido F'128 de la cepa RC1048, a la cepa RC1585 (cepa construida por conjugación entre la cepa RC688 y RC307), por medio de transducción vía infección con un derivado (mutante con alta frecuencia de transducción) del bacteriófago P22 denominado øHT105 (Scmieger, 1971). Los postransductantes se crecieron en cajas petri con medio NB y $20\mu\text{gml}^{-1}$ de tetraciclina, para asegurar la selección de aquellos que contuviesen la inserción del transposón Tn10d-tet y con ello fuesen resistentes al fármaco en cuestión.

Para asegurar que la inserción del Tn10d-tet se hubiese efectuado al interior del elemento Mud-Cam y con ello se hubiese interrumpido la secuencia del elemento manifestándose en un fenotipo de sensibilidad hacia el cloramfenicol, se efectuó replica de placa de los postransductantes en cajas petri con NB, $20\mu\text{gml}^{-1}$ de tetraciclina y $20\mu\text{gml}^{-1}$ de cloramfenicol, así como cajas con NB y $20\mu\text{gml}^{-1}$ de tetraciclina como control.

La selección de los candidatos se efectuó bajo el criterio de fenotipo de resistencia a tetraciclina y sensibilidad a cloramfenicol.

Las cepas candidatos fueron sembradas en medio verde y cruzadas con øH5 para descartar que contuviesen fagos y que fuesen sensibles a infecciones futuras.

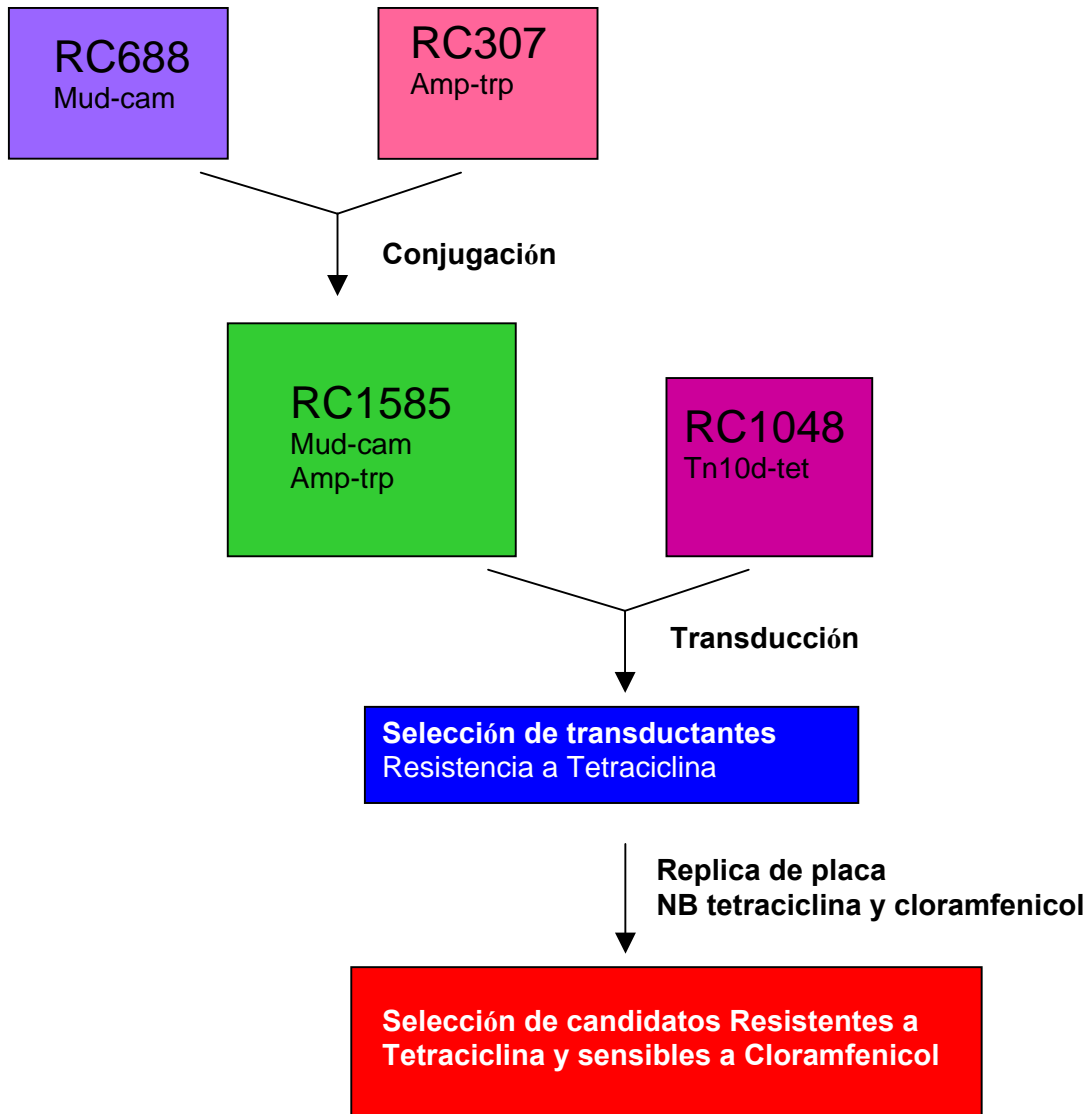


Figura 11. Diagrama de Flujo del procedimiento para la construcción del interposón

5.5.3 CONFIRMACIÓN DE CONSTRUCCIÓN DEL INTERPOSÓN

Para confirmar que el fenotipo observado correspondiese a la construcción esperada (interposón), se extrajo fago de cada una de los candidatos y se transdujo a la cepa CB3 (derivada de la cepa RC1585 y cuenta con el plásmido F'152, pero carece del plásmido con la transposasa, impidiendo de esta manera la movilización del elemento), seleccionando resistencia a tetraciclina y posteriormente realizando replica de placa en cloramfenicol. De esta forma al repetirse el fenotipo (resistencia a tetraciclina y sensibilidad a cloramfenicol), se confirmaría la construcción del interposón en alguno de los transductantes candidatos.

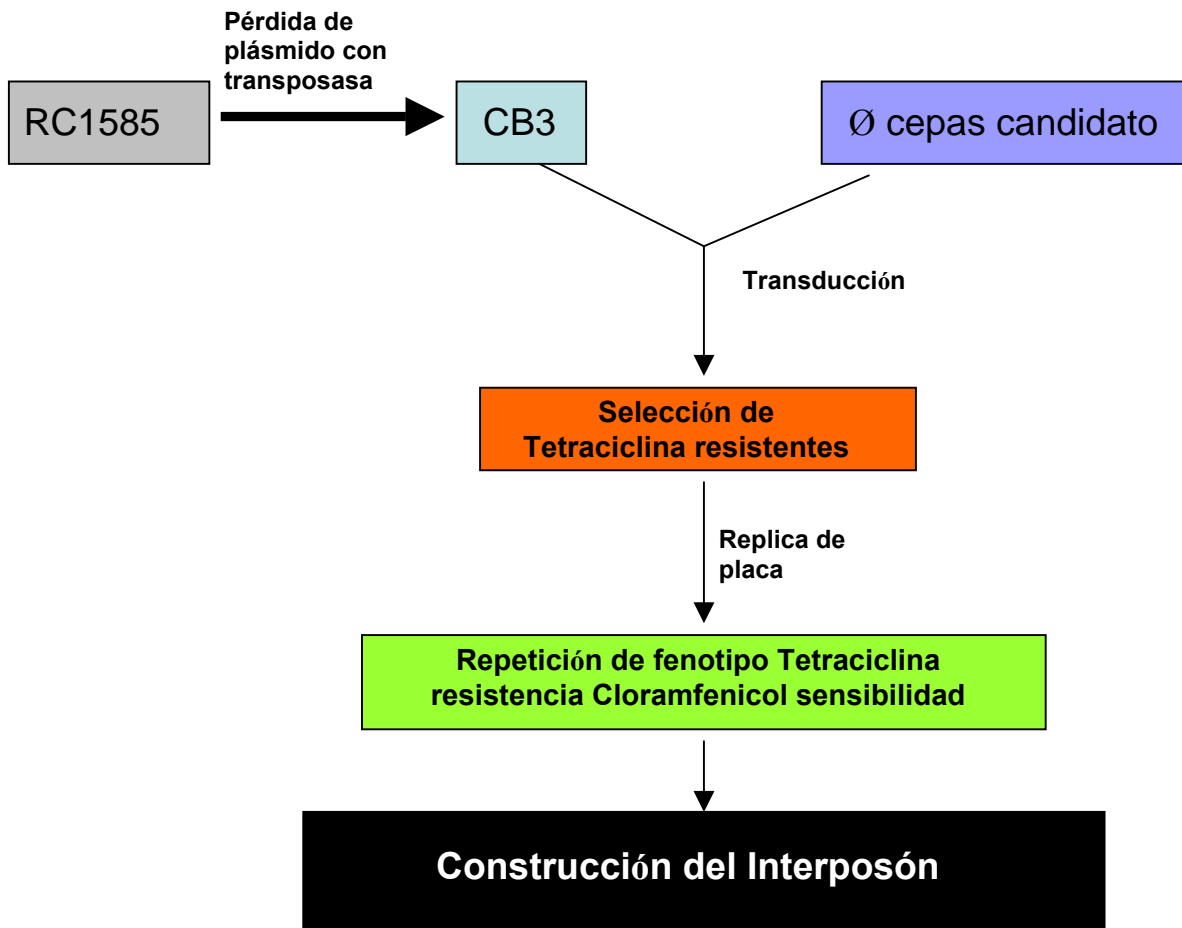


Figura 12. Diagrama de Flujo del procedimiento para la confirmación de la construcción del interposón

5.6 ACTIVIDAD

Para poder confirmar la inserción del elemento Mud-Cam en la cepa RC1497 en el gen *mdaA*, se realizó una prueba de actividad comparándola con las cepas reportadas por Salamanca-Pinzón y colaboradores en el 2006. Las cepas utilizadas se muestran en la Tabla 2, estas presentan inserciones de transposones que interrumpen la secuencia de los genes encargados de codificar para las dos nitrorreductas bacterianas presentes en *Salmonella typhimurium*. La cepa silvestre (RC1) fue empleada como control, esta cepa al carecer de inserciones presenta ambos genes activos (*mdaA* y *cnr*). La cepa RC1378 presenta una inserción en *mdaA*, por lo que solo el gen *cnr* está activo. La cepa RC1503 corresponde a una inserción en el gen *cnr*, por lo que expresa *mdaA*. Finalmente la cepa RC1517 presenta una doble inserción que impide la expresión de ambas nitrorreductas bacterianas.

Tabla 2. Cepas utilizadas en el ensayo de actividad nitrorreductasa

CEPAS	GENOTIPO	FENOTIPO	GENES DE NR PRESENTES
RC1 (Wt)	sty(LT2) wt	Silvestre	SnrA + y Cnr +
RC1378	sty(LT2) mdaA101::T-POP2	Inserción de transposon T-pop en la posición 101 del gen mdaA	Cnr +
RC1497*	sty(LT2) mdaA214::Mud-Cam	Inserción del elemento Mud-Cam en la posición 214 del gen mdaA	Cnr +
RC1503	sty(LT2) nfnB101::Mud-Cam	Inserción del elemento Mud-Cam entre el aminoácido 13 y 14 codificados por el gen cnr	SnrA +
RC1517	sty(LT2) nfnB101::Mud-Cam mdaA101::T-POP2	Doble mutante nitrorreductasa menos	Ninguno

* Ver Resultados obtenidos por PCR semialeatorio

5.6.1 Preparación de Citosol o Extracto Libre de Células (ELC)

Los cultivos utilizados se obtuvieron usando colonias únicas crecidas en medio NB con el antibiótico correspondiente. Posteriormente se extrajo el citosol o extracto libre de células (ELC) según el método descrito por Watanabe y colaboradores en 1989 (método adaptado por Salamanca-Pinzón et. al., 2006). La determinación de proteínas se llevó a cabo usando el método de Bradford (Bio-Rad®; Richmond, California) utilizando una curva estándar de BSA Sigma® (Albúmina sérica bovina) a una absorbancia a 595nm, usando un espectrofotómetro Camspec® M350T.

5.6.2 Actividad nitrorreductasa

La actividad nitrorreductasa de cada uno de los citosoles de las diferentes cepas, fue determinada mediante el decremento de la absorbancia a 340nm generado por la oxidación de NAD(P)H o NADH en presencia de Nitrofurantoína, según Liochev et. al. (1999).

La mezcla de reacción se ajustó a 1ml y contenía $250\mu\text{gml}^{-1}$ de proteína total, buffer DTT 1mM pH 7.5 y $25\mu\text{M}$ de Nitrofurantoína (Sigma®). La mezcla de reacción fue preincubada durante 10 minutos a 25°C .

Para iniciar la reacción se adicionó el cofactor ($100\mu\text{M}$ de NADH o NAD(P)H Sigma® según el ensayo), y la cuantificación del cambio de absorbancia fue monitoreada cada 20 segundos, durante los primeros 4 minutos (durante los cuales la velocidad de reacción inicial de la enzima es de forma lineal).

Se usaron las siguientes combinaciones de mezclas de reacción:

Tabla 3. Patrón de combinaciones para determinar la Actividad de Nitrorreductasa

	Buffer DTT	Nitrofurantoína 25 µM	NAD(P)H o NADH 100 µM	Citosol (Proteína total 250µgml ⁻¹)
Control 1	*	-----	*	*
Control 2	*	*	-----	*
Control 3	*	*	*	-----
RC1	*	*	*	*
RC1378	*	*	*	*
RC1497	*	*	*	*
RC1503	*	*	*	*
RC1517	*	*	*	*

La Actividad enzimática fue calculada con base en la fórmula de la ley de Lambert y Beer (1760) $V = (m \times V_r \times b)/\epsilon$, donde **m** es la pendiente, **V_r** es el volumen de reacción (en este caso 1ml), **b** es el grosor de la cubeta en la que se tomó lectura (1cm) y **ε** es el coeficiente de extinción molar (en este caso para NAD(P)H es [$\epsilon_{340} = 6.2\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$] y para NADH es [$\epsilon_{340} = 6.2\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]). Posteriormente se calculó la Actividad Específica cuya formula es **A.E.** = **V/CE**, donde V es la Actividad Enzimática y CE es la concentración de la enzima dada en mg/ml (en este caso 0.25mg/ml). Este es un ajuste de la actividad enzimática con base en la cantidad de proteína presente en la reacción analizada.

Se utilizó la prueba de Tukey como análisis estadístico para comparar las actividades observadas entre las distintas cepas y la oxidación de los cofactores NAD(P)H y NADH, para comparar la actividad existente entre las cepas mutantes reportadas por Salamanca-Pinzón en 2006, las cuales presentan inserciones en diferentes sitios de genes que codifican para las dos nitrorreductasas conocidas en *Salmonella typhimurium*.

5. 7 PCR entre transposones próximos

Se extrajo el DNA de las cepas e10 y f1 a partir de colonias únicas, crecidas en medio NB con 20µg ml⁻¹ de cloramfenicol y 20µg ml⁻¹ de tetraciclina, la extracción se llevó a cabo mediante el protocolo descrito por Sambroock et. al. en 1989 y se almacenaron a -20°C. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Idaho Technologies®, bajo las siguientes condiciones.

Para la cepa e10: Desnaturalización inicial a 94°C por 30 segundos; 5 ciclos caracterizados por una etapa de desnaturalización a 94°C por 5 segundos, alineamiento a 55°C por 1 segundo y una etapa final de polimerización a 72°C por 1 minuto, con un slope (pendiente de exigencia) de 9.9. Una segunda etapa caracterizada por 30 ciclos con una etapa de polimerización a 72°C por 1 minuto, con un slope de 9.9. Finalmente una etapa de polimerización a 72°C por 5 minutos.

Para la cepa f1, las condiciones fueron las mismas a excepción de la temperatura de alineamiento, la cual en este caso fue de 47°C.

Las mezclas para las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes finales de 10µl, conteniendo 10ng de DNA genómico bacteriano, 10pmol de cada oligonucleótido y 0.25mM de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfatados, y pudiendo contener una de las tres concentraciones de MgCl₂ 1mM (baja), 2mM (mediana) y 3mM (alta). Al final se agregó la Taq DNA polimerasa Promega® junto con el anticuerpo AntiTaq ClonTech®, el cual inactiva a la Taq DNA polimerasa hasta el momento de la amplificación, en la cual se separa de ésta al ser sometida a temperaturas de 72°C, dejando libre a la Taq DNA polimerasa, permitiendo así la extensión de la cadena.

Las muestras amplificadas por PCR se corrieron en geles de agarosa Sigma® al 1%, con buffer TAE, durante 50 minutos a 100 Volts. Posteriormente los geles fueron teñidos con una solución de 5µg ml⁻¹ de bromuro de etidio de Sigma®. Las bandas fueron visualizadas con luz UV utilizando un transiluminador (BioRad®).

Se realizaron combinaciones de oligonucleótidos para lograr la amplificación, estas estuvieron integradas por el oligonucleótido 1 (específico para los extremos del transposón Tn10d-tet) y el oligonucleótido 2 (específico de unión a uno de los extremos del elemento Mud-Cam) estas se llevaron a cabo según se indica en la Figura 13.

Se utilizó como referencia la distancia entre los dos elementos, obtenida por el coeficiente de cotransducción, como el tamaño esperado del amplificado. Este tamaño fue usado como criterio de exclusión, para la elección de candidatos.

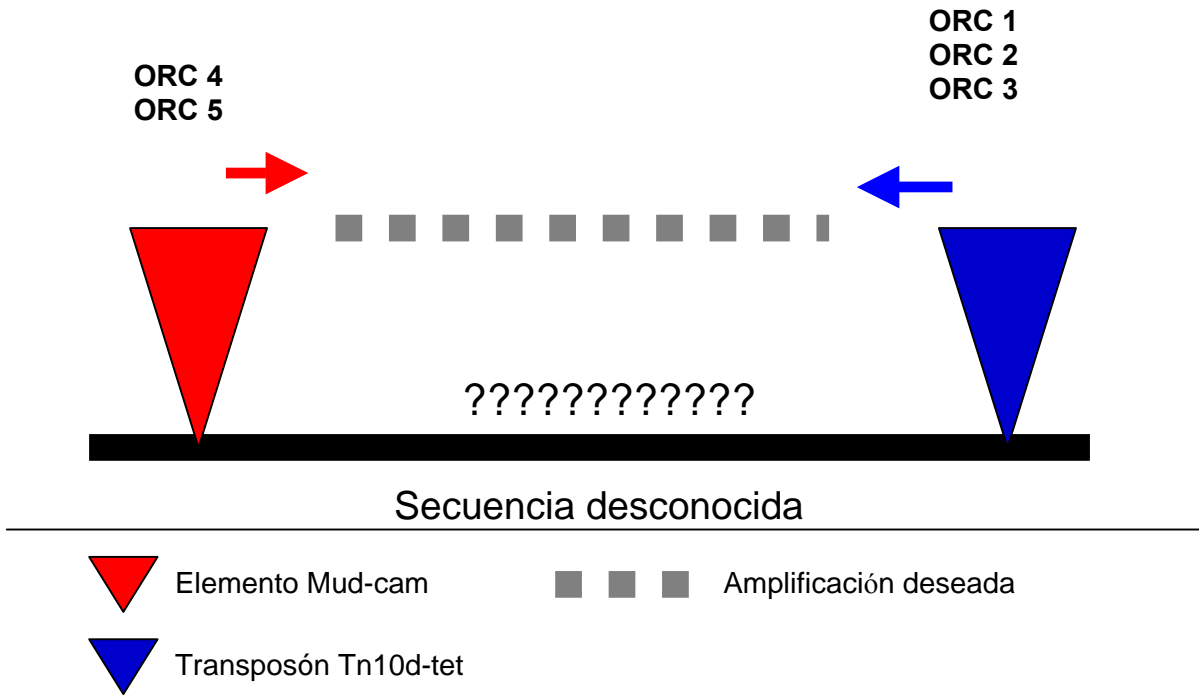


Figura 13. La figura esquematiza el mapeo por amplificación entre dos elementos cercanos, que en este caso son el elemento Mud-Cam y el Tn10d-tet.

6. RESULTADOS

6.1 CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS RC1484-RC1502 y RC1504-RC1507

Como resultado de la transducción de la cepa WT y el pool de fagos con el transposón Mud-Cam, se obtuvieron transductantes candidato cuyo fenotipo observado era la resistencia a $20\mu\text{gml}^{-1}$ de Cloramfenicol, evidenciando así la inserción del transposon Mud-Cam en el genoma bacteriano.

Posteriormente se realizó replica de placa de dichos candidatos en cajas petri con medio NB y Nitrofurantoína a una concentración de $20\mu\text{gml}^{-1}$, seleccionando así a aquellos transductantes que presentaban resistencia a ambos antibióticos. Evidenciando de esta manera que el transposón Mud-Cam no solo estaba inserto en el genoma de *Salmonella*, sino también que esta inserción había interrumpido algún gen no vital relacionado con el metabolismo y/o transporte de la nitrofurantoína, provocando así el fenotipo de resistencia a la nitrofurantoína. Dichas cepas fueron llamadas RC1484-RC1502 y RC1504-RC1507. Y su genotipo fue designado *sty*(LT2) *zzz*::Mud-Cam (*Salmonella typhimurium* LT2 con una inserción Mud-Cam en un sitio desconocido).

6.2 INTERPOSÓN

6.2.1 Construcción de la cepa RC1585

La cepa RC1585 fue construida por medio de la conjugación entre la cepa RC688 (*sty*(LT2) *strA1 nadA379*::*Tn10d-tet* / F'152 *nadA*+ Mud-Cam) la cual cuenta con el plásmido F'152 que contiene inserto un elemento Mud-Cam, y la cepa RC307 (*sty*(LT2) *metE205 DEL299*(*hisG*, *phs*, *cobI* II III) / *pNK2881 ap-Resistant*, *tnp mutant*) la cual contiene el plásmido *pNK2881* asociado con resistencia a ampicilina y la secuencia de una transposasa mutante de baja especificidad que se expresa de forma constitutiva.

La cepa RC1585 al contener la transposasa, permite al elemento Mud-Cam (el cual es deficiente en transposasa) el poder movilizarse. Y por lo tanto, permite usar a esta cepa como recipiente en posteriores transducciones.

6.2.2 Transducción entre la cepa RC1585 y RC1048

Se realizó una transducción entre las cepas RC1585 y RC1048 con el objetivo de crear un interposón (un transposón inserto (en este caso *Tn10d-tet*) dentro de otro transposón (en este caso Mud-Cam)) con el cual pudieran sustituirse las inserciones Mud-Cam originales por *Tn10d-tet*, las cuales contaban con el sitio de corte para la enzima *XbaI* y de esta forma brindar una herramienta para facilitar el mapeo de dichas inserciones usando la metodología de Electroforesis de Campo Pulsado.

Posteriormente al transducirse la cepa RC1585 (cepa recipiente) con fago extraído de la cepa RC1048 (cepa donadora), se contabilizaron $\cong 178697$ eventos independientes de inserción del transposón *Tn10d-tet* en el genoma de la cepa RC1585.

6.2.3 Replica de placa (Replica Printing)

Posteriormente se realizó replica de placa seleccionando aquellos eventos en cuyo fenotipo se observaba resistencia a Tetraciclina y sensibilidad a Cloramfenicol, esto para asegurar que el elemento inserto Tn10d-tet se hubiere insertado dentro del elemento Mud-Cam, interrumpiéndolo y consecuentemente provocando sensibilidad al cloramfenicol.

Se obtuvieron 10 candidatos cuyo fenotipo observado correspondía con el esperado teórico ($Tc^R Cm^S$).

6.2.4 Confirmación de la construcción del interposón

Para confirmar que el fenotipo observado correspondiese a la construcción esperada (interposón), se extrajo fago de cada una de los candidatos y se transdujo a la cepa CB3 (derivada de la cepa RC1585 y cuenta con el plásmido F'152, pero carece del plásmido con la transposasa, impidiendo de esta manera la movilización del elemento), seleccionando resistencia a tetraciclina y posteriormente realizando replica de placa en cloramfenicol. De esta manera si la construcción se efectuó de manera exitosa, al transducirla en una cepa que originalmente contenía el mismo plásmido con el transposón Mud-Cam y por lo tanto poseía regiones homólogas a las del interposon, era de esperar que por recombinación homóloga el elemento Mud-Cam de esta cepa fuera sustituido por el interposón y con ello al término de la selección, recuperaríamos el fenotipo de la construcción ($\cong 100\% Tc^R Cm^S$).

Posterior a la transducción y a la replica de placa se obtuvieron cepas 100% resistentes a cloramfenicol y tetraciclina, siendo esto una evidencia del fracaso en la construcción del interposón.

Con el objetivo de identificar la causa del fracaso en la construcción de dicho elemento (interposón), se planteó la posibilidad de que las cepas candidato hubiesen perdido el plásmido F'152 con la inserción del transposón Mud-Cam. Para explorar dicha posibilidad, se transdujo fago de la cepa RC456, el cual contiene un transposón Mud F (asociado a un marcador de resistencia a Kanamicina) en el plásmido F'152. Por lo cual aquellos candidatos que contasen con el plásmido F'152 adquirirían la resistencia al antibiótico Kanamicina.

Los resultados de la transducción arrojaron que 9 de los 10 candidatos estudiados perdieron el F'152, siendo solo el candidato Cd18, el único que conservaba el plásmido. Por lo cual se realizó una transducción entre la cepa CB3 y fago extraído de la cepa candidato Cd18, contabilizando de esta forma el número de veces en que ambos marcadores pasaron juntos ($Tc^R Cm^R$) y el número de veces que pasaron por separado ($Tc^R Cm^S$). Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Distancia aproximada entre los marcadores Mud-Cam y Tn10d-tet en el candidato Cd18

		Porcentaje de Cotransducción	Distancia aproximada entre los marcadores (Kpb)
Eventos en los que ambos marcadores están presentes $Tc^R Cm^R$	6	42.85%	± 6.88 kpb
Eventos en los que solo pasó uno de los marcadores está presente	8	57.15%	

La distancia aproximada entre los dos elementos transponibles fue calculada con la ecuación descrita por Wu, 1966.

Los resultados arrojaron que efectivamente no se había obtenido la construcción del interposón y que los transposones se habían insertado a una distancia aproximada de ± 6.88 kpb uno del otro.

6.3 COEFICIENTES DE COTRANSDUCCIÓN

Basándose en el hecho de que al colocar un marcador selectivo (en este caso asociado a un transposón) cercano a otro marcador y encontrándose ambos a una mínima distancia entre ellos, es posible que al transducirlos nuevamente en una cepa que carezca de ambos marcadores y al cuantificar el número de veces que ambos marcadores pasan juntos (frecuencia de cotransducción) se pueda obtener la distancia aproximada a la que se encuentran alejados ambos marcadores.

De esta manera se realizó la transducción del marcador selectivo de resistencia a tetraciclina asociado al transposón Tn10d-tet contenido en fagos P22 (Φ Pool RC69/RC302), con los cuales se infectaron las cepas candidato RC1484-1502 y 1504-1507 que contenían el marcador selectivo de resistencia a cloramfenicol asociado al transposón Mud-Cam. Tabla 5.

Tabla 5. Cepas utilizadas en mapeo por coeficientes de cotransducción

Cepas Utilizadas	Genotipo
RC 69*	sty(LT2) proAB47 / F' pro+ lac+ zzf-1831::Tn10d-Tet
RC 302*	sty(LT2) pNK2881 ap-Resistant, tnp mutant
RC1484-RC1502 RC1504-RC1507	sty(LT2) zzz-::Mud-Cam

* Cepas que conformaban el pool de fagos usados en la infección de las cepas RC1484-1502 y RC1504-1507. RC69 (Contiene un plásmido F' que contiene el transposón Tnd-tet). RC302 (Contiene el plásmido pNK2881, el cual contiene una transposasa mutante y que permite la movilización del elemento Tn10d-tet).

En la transducción se siguió el marcador de tetraciclina y posteriormente se realizó réplica de placa para seleccionar de entre los candidatos a aquellos que presentaran resistencia a Tetraciclina (es decir que el Tn10d-tet se hubiese insertado en el cromosoma) y que fuese sensible a Cloramfenicol, ya que al reemplazarse un marcador por otro, es la máxima expresión de la mínima distancia; dicho de otra forma, al encontrarse ambos marcadores tan cercanos uno del otro, uno impide la expresión del otro. De esta forma se obtuvieron tres candidatos que presentaban el fenotipo $Cm^S Tc^R$, dos de los cuales fueron originados de la cepa RC1507 pero siendo inserciones independientes, a estos candidatos se les nombró V5 y V9. Por otra parte un tercer candidato fue aislado y denominado H9, este candidato se derivó de la cepa RC1491.

Posteriormente para asegurar que ambos marcadores se encontrasen cercanos uno del otro, se extrajo fago de cada uno de los candidatos (Φ H9, Φ V5 y Φ V9) y se transdujo a la cepa original correspondiente (el Φ H9 se transdujo a la cepa RC1491, el Φ V5 se transdujo a la cepa RC1507 y el Φ V9 se transdujo a la cepa RC1507) y se seleccionó el marcador de tetraciclina.




Luego de la transducción se seleccionó de entre los postransductantes resistentes a tetraciclina, por medio de replica de placa, a aquellos candidatos que fuesen resistentes a ambos marcadores, cloramfenicol y tetraciclina ($Tc^R Cm^R$), es decir, aquellos que portasen

ambos marcadores lo más próximos posible entre ellos. De esta manera se recuperaron tres candidatos, d5 (V5), e10 (V9) y f1 (H9).

Finalmente de estos candidatos se extrajo fago p22 que hubiese empaquetado fragmentos de DNA de cada uno de los tres candidatos (Φ d5, Φ e10 y Φ f1) y se transdujeron a la cepa silvestre. Se dividió el experimento en dos grupos, en el primer grupo se seleccionó resistencia a cloramfenicol y en el segundo grupo se seleccionó resistencia a tetraciclina. Se realizó replica de placa y se contabilizó el número de veces en que ambos marcadores pasaron juntos ($Cm^R Tc^R$). Tabla 6.

Tabla 6. Localización de transposones por frecuencia de cotransducción.

	# de Colonias resistentes al antibiótico de selección	# de colonias Tc Cm resistentes	Porcentaje de Cotransducción	Distancia aproximada entre los marcadores (Kpb)	Promedio de distancia aproximada entre los marcadores (Kpb)
V5 Seleccionando Tc resistencia	500	436	87.2%	≈1.46	≈1.78
V5 Seleccionando Cm resistencia	500	406	81.2%	≈2.1	
V9 Seleccionando Tc resistencia	500	446	89.2%	≈1.2	≈2.2
V9 Seleccionando Cm resistencia	1128	831	73.67%	≈3.2	
H9 Seleccionando Tc resistencia	2128	1464	68%	≈3.85	≈3.45
H9 Seleccionando Cm resistencia	3843	2865	74%	≈3.05	

-  Grupo A (Selección del marcador de Tetraciclina)
-  Grupo B (Selección del marcador de cloramfenicol)
-  Promedio aproximado de distancias entre los dos transposones

La fórmula empleada para calcular el coeficiente de cotransducción fue descrita por Wu en 1966.³

$$100/C=1+[(k-m)^3-(k-m-s)^3]/(k-m-n-s)^3]$$

- C** Porcentaje de cotransducción
- k** Tamaño de partícula transducida (en el caso de **P22** es de **42kpb**)
- m** Tamaño del marcador donado en kpb
- n** Tamaño del marcador no seleccionado en kpb
- s** Distancia entre los marcadores en kpb

Para el Grupo A, el marcador donado fue Tn10d-tet cuyo tamaño corresponde a 2.9kpb, mientras que el marcador no seleccionado fue Mud-Cam de 2.5kpb. Mientras que para el Grupo B, el tamaño del marcador donado fue de 2.5kpb correspondiente al elemento Mud-Cam, y el marcador seleccionado fue Tn10d-tet (2.9kpb).

6.4 CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (CMI)

Con el objetivo de descartar de entre las cepas RC1484-1502 y RC1503-1507 a aquellas en las cuales el fenómeno de resistencia hubiese sido producto de mutación espontánea y no por la inserción del transposón Mud-Cam se realizó una transducción, recuperando el transposón Mud-Cam, junto con parte de la secuencia correspondiente a su sitio de inserción, en partículas de p22; éstas al ser transducidas nuevamente a la cepa silvestre, recuperarían su sitio original de inserción por medio de recombinación homóloga, descartándose así las mutantes espontáneas.

Así mismo con la finalidad de agrupar a estas cepas con base en su fenotipo de resistencia a Nitrofurantoína y seleccionar candidatos para el mapeo, se determinó el CMI de cada una de las cepas. Para este ensayo se utilizó a la cepa silvestre RC1 (WT) como control, se probaron distintas concentraciones de nitrofurantoína y el ensayo fue realizado tanto en condiciones de aerobiosis como en anaerobiosis. Tabla 7.

Tabla 7. Resultados del ensayo de determinación del MIC

Cepas	0 µg/ml NFN	2µg/ml NFN	4µg/ml NFN	6µg/ml NFN	8µg/ml NFN	10µg/ml NFN	12µg/ml NFN	15µg/ml NFN	18µg/ml NFN	20µg/ml NFN	22µg/ml NFN	25µg/ml NFN
RC1 WT	+	+	+	+	--	--	--	--	--	--	--	--
RC1484	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--
RC1485	+	+	+	+	--	+	--	+	--	--	--	--
RC1486	+	+	+	--	+	--	--	--	--	--	--	--
RC1487	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--
RC1488	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	--	--
RC1489	+	+	+	+	+	+	--	+	--	--	--	--
RC1490	+	+	+	+	+	+	--	+	--	--	--	--
RC1491	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	--	--
RC1492	+	+	+	+	+	--	+	--	--	--	--	--
RC1493	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	--
RC1494	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	--	--
RC1495	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--
RC1496	+	+	+	+	+	--	+	--	+	--	--	--
RC1497	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	--	--
RC1498	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	--	--
RC1499	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--
RC1500	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--
RC1501	+	--	+	--	--	--	--	--	--	--	--	--
RC1502	+	+	+	+	--	--	--	--	--	--	--	--
RC1504	+	--	+	--	--	--	--	--	--	--	--	--
RC1505	+	+	+	+	+	--	--	--	--	--	--	--
RC1506	+	+	+	+	+	--	+	--	+	--	--	--
RC1507	+	--	+	--	--	--	--	--	--	--	--	--
H9	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	--	--
V5	+	+	+	+	+	--	--	--	--	--	--	--
V9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	--

Símbolos: (+) Crecen ; (--) No Crecen ;

Aerobiosis

Anaerobiosis (Concentración parcial de O₂ 0.5 ppm)

Las cepas RC1485, RC1489, RC1490, RC1495, RC1496 y RC1506 presentaron una CMI igual a la de la cepa WT en alguna de las dos condiciones probadas (aerobiosis o anaerobiosis) y doblaron el CMI en la otra. Así mismo las cepas RC1486 y RC1502 resultaron ser más sensibles a la Nitrofurantoína en condiciones de anaerobiosis que la cepa silvestre. Mientras que las cepas RC1501, Rc1504 y RC1507 presentaron una CMI inferior al de la cepa WT tanto en condiciones de aerobiosis como en anaerobiosis.

Se consideraron candidatos para el mapeo aquellas cepas en las cuales el CMI en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis hubiese doblado el CMI de la cepa silvestre. Así pues las cepas RC1484, RC1487, RC1488, RC1491, RC1493, RC1494, RC1497, RC1498, RC1499 y RC1500 fueron elegidas como candidatos para mapear la inserción del transposón. Tabla 8.

Tabla 8. Cepas usadas para rastrear inserciones del transposón Mud-Cam elegidas por CMI.

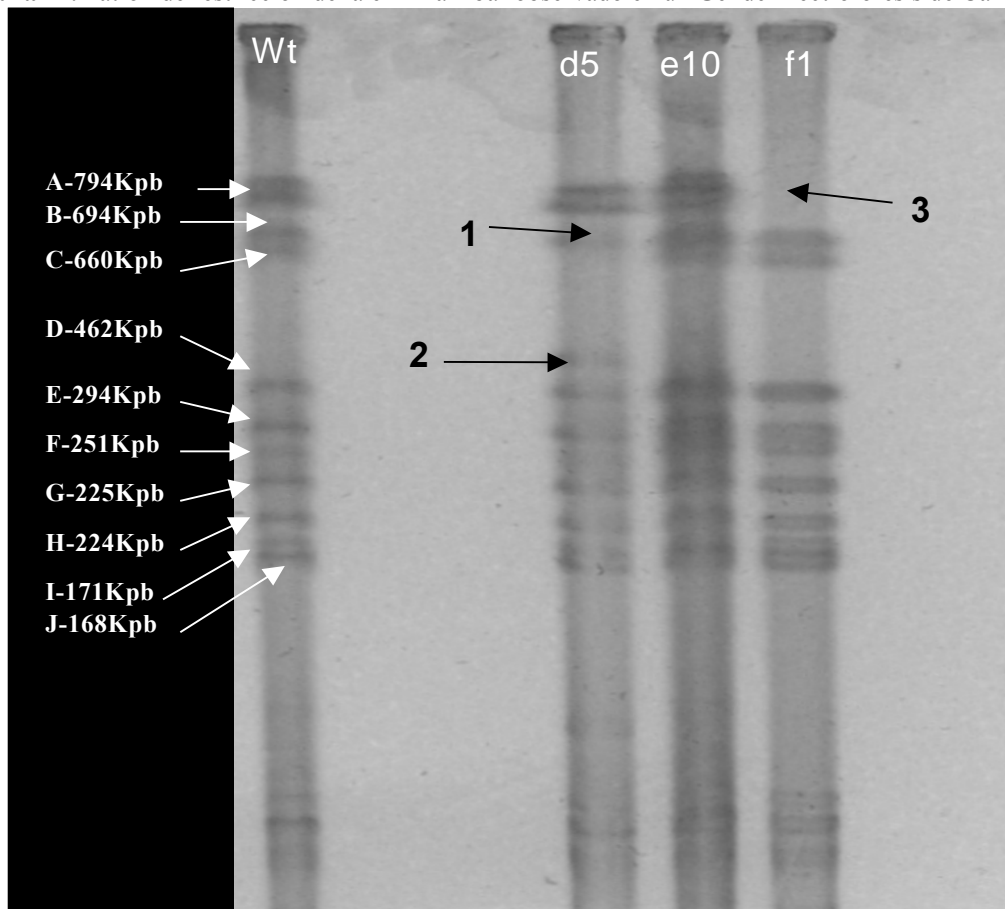
Cepas	[] NFN μgml^{-1} Aerobiosis	[] NFN μgml^{-1} Anaerobiosis
1484	15 μgml	12 μgml
1487	15 μgml	19 μgml
1488	8 μgml	10 μgml
1491	8 μgml	10 μgml
1493	12 μgml	15 μgml
1494	8 μgml	12 μgml
1497	8 μgml	15 μgml
1498	8 μgml	15 μgml
1499	8 μgml	8 μgml
1500	8 μgml	8 μgml

Con lo que respecta a las cepas H9 (derivada de la transducción de la cepa RC1491 y el pool de fagos RC69/RC302), V5 y V9 (derivadas de la transducción de la cepa RC1507 y el pool de fagos RC69/RC302) se evaluó el CMI con el objetivo de verificar si eran candidatos para el mapeo. Siendo solo H9 candidato para mapeo puesto que tanto el candidato como la cepa de la cual se originó presentan una CMI que dobla el CMI de la cepa silvestre. Mientras que el candidato V5 queda descartado ya que su CMI es igual al del control; por otra parte el candidato V9 queda también descartado puesto que aunque su CMI es muy superior al de la cepa WT (10 $\mu\text{g/ml}$ de NFN en condiciones de aerobiosis y 25 $\mu\text{g/ml}$ de NFN en anaerobiosis), la cepa de la cual se derivó presenta un CMI inferior al la cepa silvestre bajo ambas condiciones.

6.5 ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE)

En la Electroforesis de campo pulsado se usó como control el patrón de corte de la enzima XbaI en la cepa silvestre de *Salmonella typhimurium* (RC1), dicho patrón fue comparado con los patrones de corte de la misma enzima con las cepas d5 (V5 (RC1507)), e10 (V9 (RC1507)) y f1 (H9 (RC1491)), a fin de poder identificar la aparición de nuevas bandas, ya que al contar con la presencia de dos transposones muy cercanos uno del otro, y que uno de dichos transposones (Tn10d-tet) contenía un sitio de corte para la enzima XbaI ubicado dentro del gen *tetA*, deberíamos observar la desaparición de una banda de mayor peso y la aparición de nuevas bandas diferentes al patrón observado en la cepa silvestre, siendo este un indicativo de la presencia del transposón Tn10d-tet. Y de esta manera, al realizar un mapeo físico, basado en la distancia aproximada del corte y la distancia entre ambos transposones, se podría ubicar el contexto en el cual se insertó el transposón Mud-Cam y de esta forma se podría también ubicar los genes que podrían estar involucrados en la resistencia a la nitrofurantoína.

Figura 14. Patrón de restricción de la enzima XbaI observado en un Gel de Electroforesis de Campo Pulsado.



En el candidato d5* se observa la desaparición de una banda de 660kpb (1) y la aparición de una banda de ≈ 495.3 kpb (2). En el candidato e10** se observa el mismo patrón de restricción observado en la cepa silvestre. En el candidato f1*** se observa la desaparición de la banda de 794kpb (3), pero no es posible observar la aparición de una nueva banda.

* Candidato derivado de la cepa V5 originada de la transducción entre la cepa RC1507 y el pool de fagos $\Phi 69/302$.

** Candidato derivado de la cepa V9 originada de la transducción entre la cepa RC1507 y el pool de fagos $\Phi 69/302$.

*** Candidato derivado de la cepa H9 originada de la transducción entre la cepa RC1491 y el pool de fagos $\Phi 69/302$.

En la cepa d5* (Figura 14) se observó la desaparición de una banda de aproximadamente 660kpb y la aparición de otra banda de aproximadamente $\cong 495.3$ kpb. Sin embargo luego de calcular el CMI de esta cepa se descartó la posibilidad de usarla como candidato para el mapeo, puesto que su CMI era igual al de la cepa WT y la cepa original de la cual se derivó posee un CMI inferior al de la cepa silvestre.

Por lo que respecta a la cepa e10** no se observó cambio en el patrón de bandeo en comparación con el observado en la cepa silvestre y aunque el CMI de este candidato es superior al de la cepa silvestre, la cepa de la cual se originó (RC1507) posee un CMI inferior al de la cepa WT, por lo cual se descarta su uso como candidato en el mapeo.

Finalmente en la cepa f1*** también se observa la desaparición de la banda de 794kpb, sin embargo bajo las condiciones de corrida del gel no fue posible visualizar las bandas de menor peso producto del corte de la enzima.

Debido a estos resultados se optó por realizar el mapeo utilizando una estrategia de amplificación por PCR.

6.6 PCR ENTRE DOS TRANSPOSONES

La siguiente estrategia de mapeo fue la amplificación del fragmento existente entre ambos transposones utilizando primers que se anclasen a los extremos terminales de cada uno de ellos, basándonos en el hecho de que la distancia entre ambos transposones obtenida por la estimación de los coeficientes de cotransducción oscila entre 2.2kpb y 3.45kpb, encontrándose esta medida dentro de los límites de amplificación del PCR, es por lo tanto posible obtener la amplificación correspondiente al contexto en el cual se llevó a cabo la inserción e identificar los genes involucrados en la resistencia a nitrofurantoína.

En esta estrategia se utilizaron los oligonucleótidos ORC 1-5 y como controles, los oligonucleótidos ORC27 y 28 (Tabla 9)

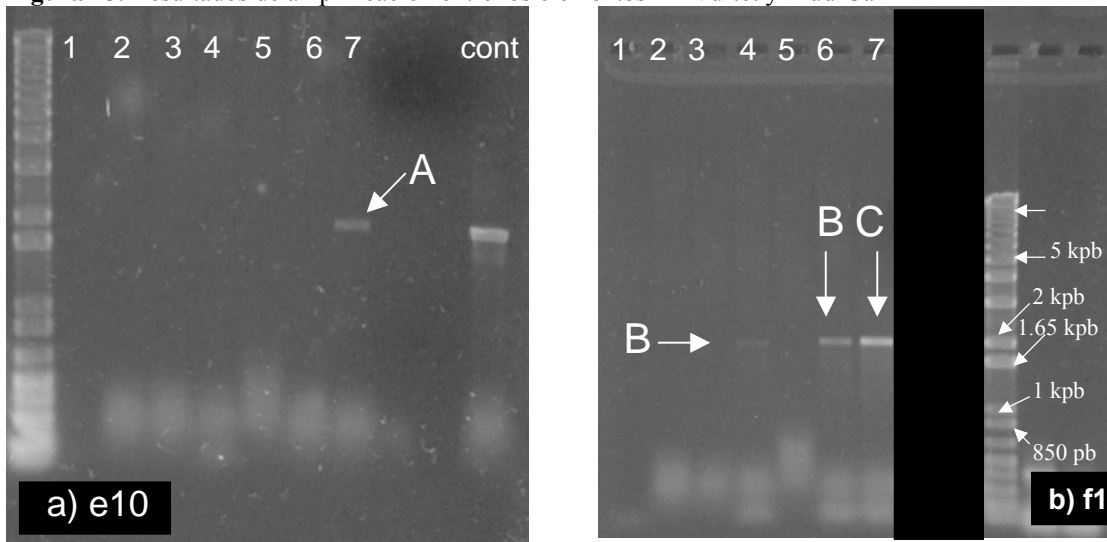
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados en amplificación por PCR entre los elementos insertos Tn10d-tet y Mud-Cam.

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA	CARACTERISTICAS
ORC1	GACAAGATGTGTATCCACCTTAAC	Este elemento contiene una secuencia repetida invertida de 70pb y está dirigido hacia ambos lados externos del elemento Tn10
ORC2	ACCTTTGGTCACCAACGCTTTTCC	Está diseñado para anclarse al final de tetA en la misma dirección que la replicación del elemento, hacia la izquierda del elemento.
ORC3	TCCATTGCTGTTGACAAAGGGAAT	Está diseñado para anclarse al final de tetR, dirigido a la derecha del elemento Tn10
ORC4	ATCCCGAATAATCCAATGTCC	Está diseñado para anclarse al exterior del elemento Mu en la región izquierda y en la posición 37 en el 3' del oligo antes de terminar Mu
ORC5	GAAACGCTTTCGCGTTTTTCGTGC	Está diseñado para anclarse al exterior del elemento Mu en la región derecha
ORC27	CGGACAATCCACCCGCCAAAAATCA	Está diseñado para anclarse en amyA, a 148 pb antes del inicio de RBS; con ORC28 genera un producto de 1999 pares de bases.
ORC28	GCAGTCAAAAAGGCCCGCAACGTAA	Está diseñado para anclarse en amyA, a 308 pb después del sitio de término del gen.

Se utilizó la amplificación del gen de amilasa (amyA) como control positivo, usando los oligonucleótidos ORC27 y ORC28. Se usaron tres controles negativos, los cuales pueden observarse en la figura 15, en el carril número 1 se colocaron todos los componentes necesarios para la amplificación a excepción del templado (ADN), en el carril número 2 se colocaron todos los componentes pero se omitió el oligonucleótido 1 y en el carril número 3 se omitió de igual manera colocar el segundo oligonucleótido. De tal forma que la amplificación esperada debería encontrarse dentro de los parámetros del peso equivalente a la distancia en la que se encontraban los transposones y solo presentarse en presencia de todos los componentes (carril número 4, 5, 6 ó 7).

De la misma forma se probaron diferentes condiciones de salinidad para obtener la amplificación deseada.

Figura 15. Resultados de amplificación entre los elementos *Tn10d-tet* y *Mud-Cam*



- a) Candidato e10. Carril 1 control negativo sin templado; carril 2 control negativo sin primer 1; carril 3 control negativo sin primer 2; carril 4 y 6 mix completo en condiciones mediana salinidad; carril 5 mix completo con baja salinidad; carril 7 mix completo con alta salinidad; (cont) control positivo amplificación de *amyA*. (A) banda obtenida cuyo peso aproximado es de 2.2kpb, lo cual coincide con la distancia existente entre los elementos *Mud-Cam* y *Tn10d-tet*.
- b) Candidato f1. Carril 1 control negativo sin templado; carril 2 control negativo sin primer 1; carril 3 control negativo sin primer 2; carril 4 y 6 mix completo con mediana salinidad; carril 5 mix completo con baja salinidad; carril 7 mix completo con alta salinidad. (B) banda obtenida con mediana salinidad, (C) banda obtenida con alta salinidad, en ambos casos el peso aproximado es de ± 2 kpb aproximándose a la distancia existente entre los elementos *Mud-Cam* y *Tn10d-tet*

Se obtuvieron amplificaciones que correspondían a la distancia estimada existente entre los elementos *Mud-Cam* y *Tn10d-tet* en ambos candidatos e10 y f1. Con el candidato e10 se obtuvo una banda de aproximadamente 2kpb, bajo condiciones de 30mM de $MgCl_2$ usando los primers *ORC2* y *ORC4* con una temperatura de alineamiento de 55°C. Por lo que respecta el candidato f1, se obtuvieron dos bandas de aproximadamente 2.1kpb bajo condiciones de mediana salinidad (20mM de $MgCl_2$) y alta salinidad (30mM de $MgCl_2$), usando los primers *ORC2* y *ORC4* con una temperatura de alineamiento de 47°C. Sin embargo no fue posible llevar a cabo la reamplificación de estas bandas bajo las mismas condiciones de amplificación iniciales.

6.7 PCR SEMIALEATORIO

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados en el mapeo por PCR semialeatorio.

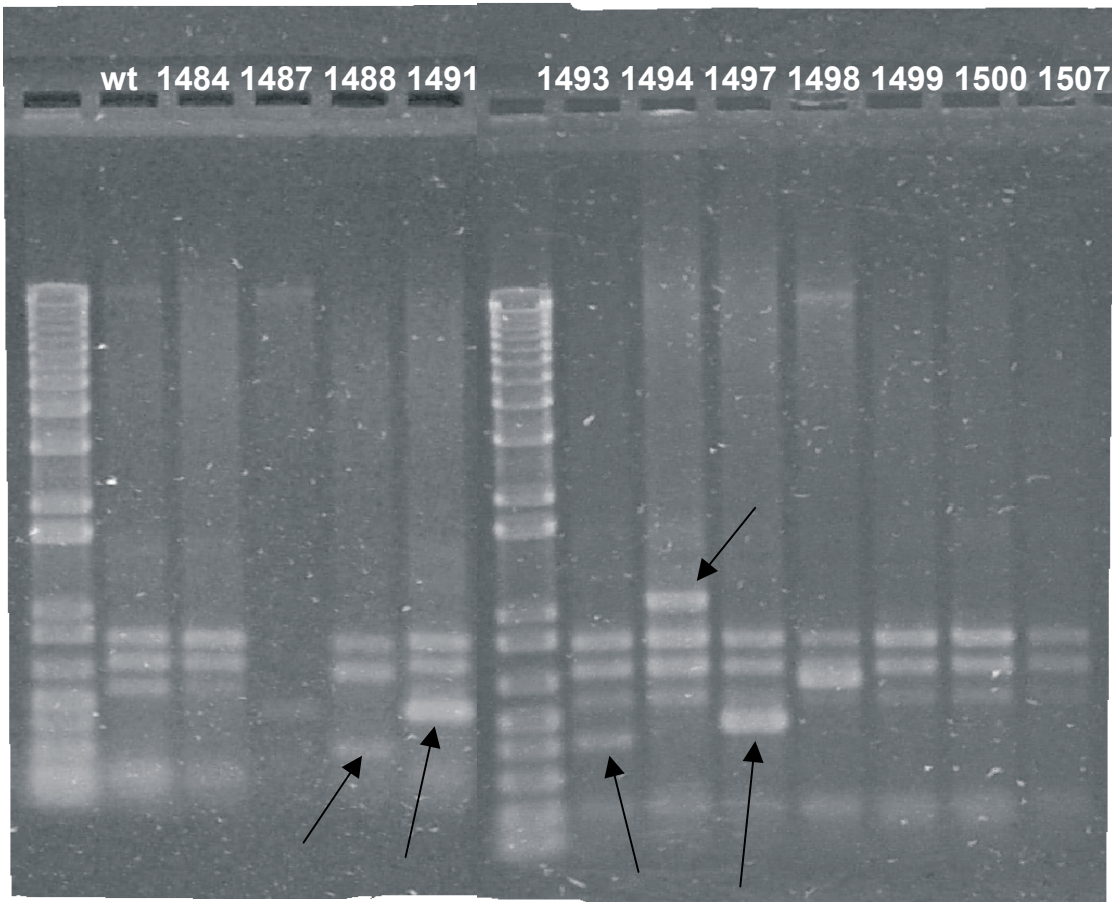
OLIGOS*	SECUENCIA	CARACTERISTICAS
ORC4	ATCCCGAATAATCCAATGTCC	Está diseñado para anclarse al exterior del elemento Mu en la región izquierda y en la posición 37 en el 3' del oligo antes de terminar Mu
ORC5	GAAACGCTTTCGCGTTTTTCGTGC	Está diseñado para anclarse al exterior del elemento Mu en la región derecha
ORC27	CGGACAATCCACCCGCCAAAAATCA	Está diseñado para anclarse en amyA, a 148 pb antes del inicio de RBS, con ORC28 genera un producto de 1999 pares de bases.
ORC28	GCAGTCAAAGGCCCGCAACGTAA	Está diseñado para anclarse en amyA, a 308 pb después del sitio de término del gen.
ORC6	ACTTCTCAACAACCTCAGGACGAACANNNNNNNNNNNGCAGC	Contiene una secuencia de 5 bases que se anclan al azar, así como una secuencia específica (secuencia P) en la parte terminal. La quinta base es G.
ORC7	ACTTCTCAACAACCTCAGGACGAACANNNNNNNNNNNACAGC	Contiene una secuencia de 5 bases que se anclan al azar, así como una secuencia específica (secuencia P) en la parte terminal. La quinta base es A.
ORC8	ACTTCTCAACAACCTCAGGACGAACANNNNNNNNNNNTCAGC	Contiene una secuencia de 5 bases que se anclan al azar, así como una secuencia específica (secuencia P) en la parte terminal. La quinta base es T.
ORC9	ACTTCTCAACAACCTCAGGACGAACANNNNNNNNNNNCAGC	Contiene una secuencia de 5 bases que se anclan al azar, así como una secuencia específica (secuencia P) en la parte terminal. La quinta base es C.
ORC10 (Primer P)	ACTTCTCAACAACCTCAGGACGAACA	Está diseñado para anclarse en la secuencia P que se encuentra en los oligonucleótidos de anclaje aleatorio.

* Oligonucleótidos

Las cepas que se utilizaron para el mapeo de las inserciones Mud-Cam por PCR semialeatorio fueron elegidas por su CMI (tabla 8). Se usó el patrón de amplificación de los oligonucleótidos degenerados (de anclaje aleatorio) en combinación con los oligonucleótidos ORC4 y ORC5 en la cepa silvestre RC1, para descartar amplificaciones no dependientes de la presencia del elemento Mud-Cam.

Las bandas obtenidas que diferían del patrón de amplificación observado en la cepa WT fueron seleccionadas para la prueba de dependencia. (Figura 16).

Figura 16. PCR semialeatorio



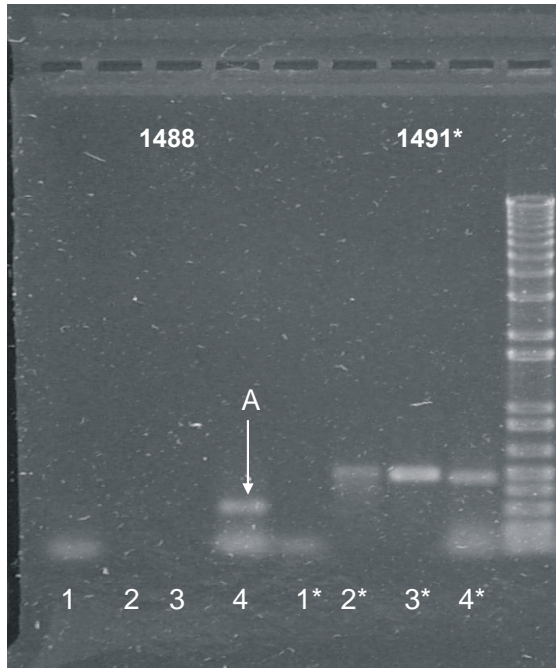
(→) Bandas candidato que difieren del patrón de amplificación de la cepa WT

Las bandas se reamplificaron usando el primer de anclaje al transposón Mud-Cam y el oligonucleótido P (primer P), y se seleccionaron solo aquellas en las que la amplificación fuera dependiente de ambos oligonucleótidos. De esta manera se obtuvo amplificación dependiente de ambos oligonucleótidos en las cepas RC1488 y RC1497.

En la cepa RC1488 se obtuvo un producto de amplificación de ~300pb y en la cepa RC1497 de ~500pb (Figura 17). Dichos productos fueron secuenciados.

Figura 17. Prueba de dependencia

A



(A→) Banda dependiente de ambos oligonucleótidos

A. Cepa RC 1488

Carril 1, carece de templado
Carril 2, carece del oligonucleótido que ancla en el transposón.

Carril 3, carece del oligonucleótido que ancla en la secuencia P.

Carril 4, contiene ambos oligonucleótidos y el templado.
Se observa una amplificación A, la cual es dependiente de ambos oligonucleótidos.

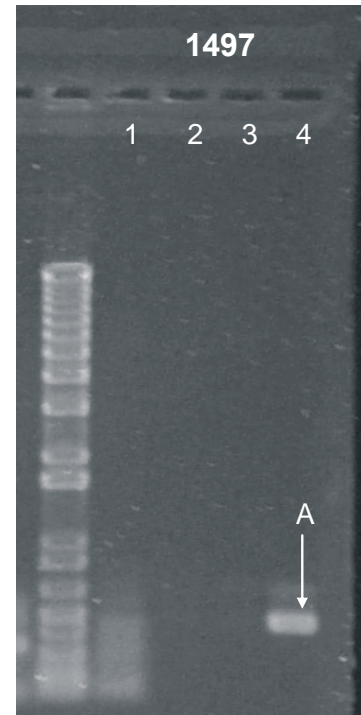
Cepa RC1491

Carril 1, carece de templado
Carril 2, carece del oligonucleótido que ancla en el transposón. Existe amplificación, por lo tanto el anclaje no es dependiente de ambos oligonucleótidos.

Carril 3, carece del oligonucleótido que ancla en la secuencia P. Existe amplificación, por lo tanto el anclaje no es dependiente de ambos oligonucleótidos.

Carril 4, contiene ambos oligonucleótidos y el templado. Debido a que la amplificación se llevó a cabo sin dependencia de ambos oligonucleótidos, se descarta como candidato.

B



B. Cepa RC1497

Carril 1, carece de templado
Carril 2, carece del oligonucleótido que ancla en el transposón.

Carril 3, carece del oligonucleótido que ancla en la secuencia P.

Carril 4, contiene ambos oligonucleótidos y el templado. Se observa una amplificación A, la cual es dependiente de ambos oligonucleótidos.

6.8 SECUENCIACIÓN

De la secuenciación de la amplificación de 300pb obtenida de la cepa RC1497 se obtuvo la secuencia; esta fue comparada con el genoma de *Salmonella typhimurium LT2* mediante un BLAST 2.2.14. Se encontró que el transposón Mud-Cam se insertó en la secuencia correspondiente al gen *mdaA* cuyo producto corresponde a la nitrorreductasa A insensible al oxígeno, dicha inserción se ubicó en la posición +214 a 25 codones del carboxilo terminal, interrumpiendo el codón de histidina de la hélice α -J. Figuras 18 y 19.

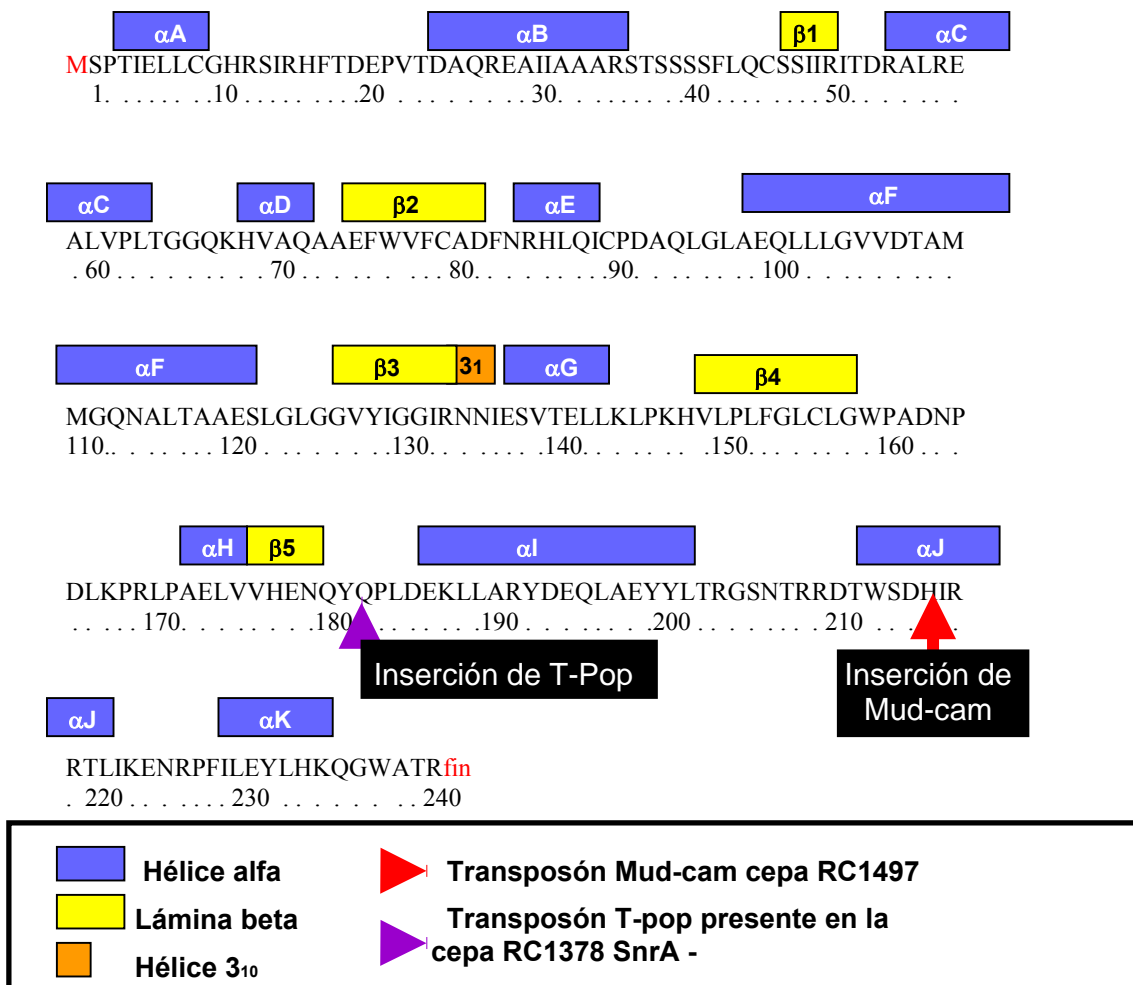


Figura 18. En la Figura se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína SnrA, marcándose con barras los elementos de la estructura secundaria, las alfa hélices se marcan con cuadros azules y con amarillo para las hojas- β . Se muestra con una flecha roja, la inserción del transposón Mud-Cam en la posición +214, la cual al parecer interrumpe la secuencia correspondiente a la α -hélice J de la proteína. En morado se muestra el sitio de inserción del transposón T-Pop presente en una cepa SnrA - (RC1378) utilizada como control, en los ensayos de actividad nitrorreductasa. Modificado de Parkinson et. al. 2000

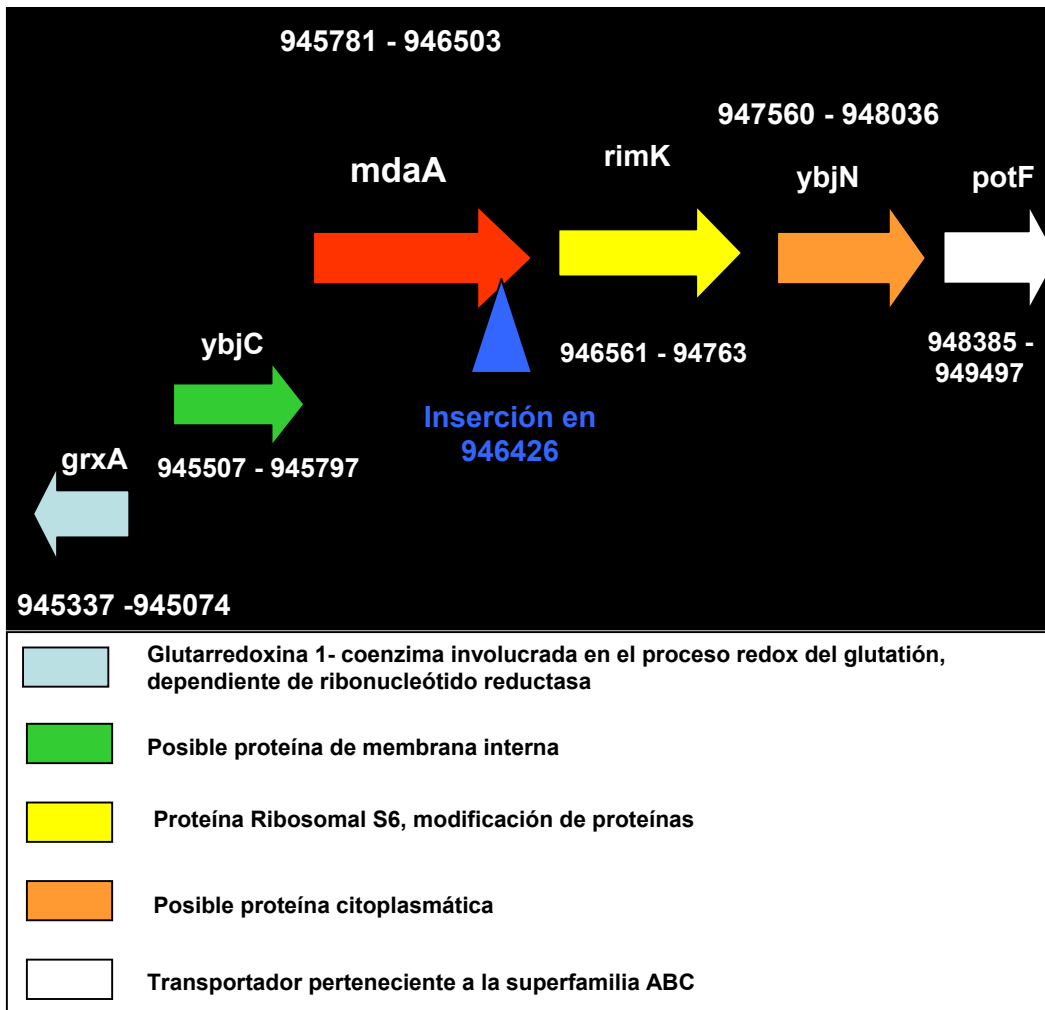


Figura 19. En la Figura se muestra el contexto de inserción del transposón Mud-Cam (representado como un triángulo azul) en el extremo terminal del gen mdaA (flecha naranja). Las flechas indican el sentido de lectura de los genes. Se puede observar que el gen mdaA se encuentra flanqueado río abajo por el gen ybjC el cual se cree codifica para una proteína de la membrana interna y río arriba por el gen rimK el cual codifica para una proteína ribosomal.

6.9 TRANSPORTADOR ABC

De igual forma el producto obtenido de la amplificación de 500pb de la cepa RC1488 fue secuenciado y dicha secuencia fue comparada con el genoma de *Salmonella typhimurium* LT2 mediante un BLAST. El resultado del análisis arrojó que el transposón Mud-Cam se insertó en una secuencia intergénica en la posición 896218, ubicada a 86pb del sitio de unión ribosomal del gen glnP y a 46pb del gen glnH (figura 20) los cuales corresponden a los genes que codifican respectivamente para el componente de membrana del transportador ABC de glutamina y para la proteína de unión de alta afinidad para el transporte de la glutamina, estos dos genes codifican para dos de las tres subúnicas del transportador ABC de glutamina. Cabe destacar que estos dos genes junto con glnQ

(codifica para una proteína de unión a ATP, tercer componente del transportador ABC de glutamina) componen un operón, el cual se ve interrumpido por la inserción del transposón Mud-Cam.

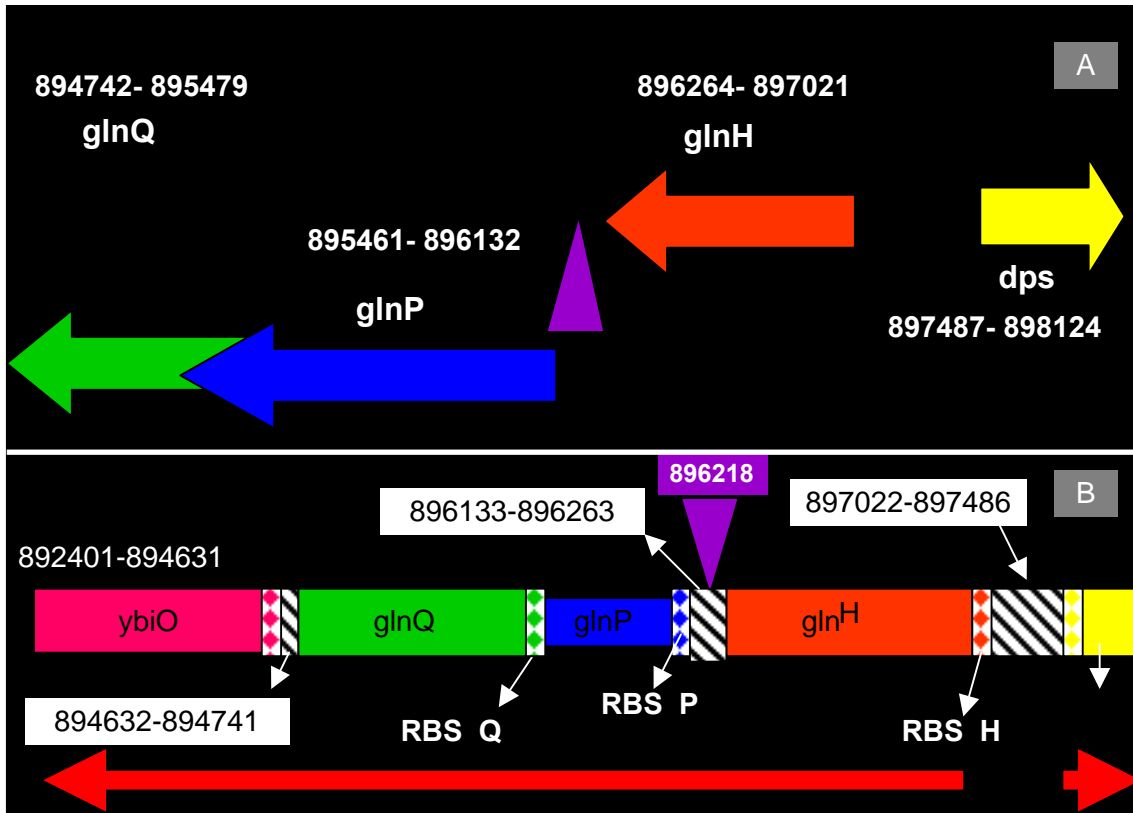


Figura 20. En la Figura se muestra el contexto de inserción del transposón Mud-Cam en la cepa RC1488. A) Se observan marcados con flechas los genes contiguos al sitio de inserción del transposón y en color morado se representa con un triángulo el transposón; el sentido de las flechas indica la orientación de los genes. B) Se muestra el contexto de inserción del transposón de forma lineal, se muestran en rectángulos cuadriculados los sitios de unión a ribosomas correspondientes a cada gen y en cuadros blancos con líneas paralelas las regiones intergénicas (en los recuadros blancos se indica la extensión de dichas zonas en pb). *dps* es un gen que codifica para una proteína relacionada con respuesta al estrés oxidante. *ybiO* es un gen putativo que codifica para un transportador.

6.10 ACTIVIDAD

Tras obtener la ubicación de la inserción del elemento Mud-Cam en la cepa RC1497 (la cual se ubicó en la posición +214 del gen *mdaA*), era necesario confirmar que esta inserción al encontrarse en uno de los extremos del gen, podría o no producir un producto trunco que careciera de actividad enzimática; puesto que el producto del gen *mdaA* corresponde a la nitrorreductasa A insensible al oxígeno, dicha inserción podría manifestarse en la pérdida de actividad enzimática o en decremento de ésta, por parte de la Nitrorreductasa A insensible al oxígeno. Para verificarlo se llevó a cabo un ensayo de

actividad en el cual se utilizaron en comparación con la cepa RC1497, la cepa silvestre RC1 WT, la cual al carecer de inserciones sirve como control positivo para la actividad de ambas Nitrorreductas A (SnrA +) y B (NfnB +). La cepa RC1503 (la cual posee una inserción en el gen *cnr* y cuyo fenotipo es SnrA+, NfnB-) junto con la cepa RC1517 (la cual posee dos inserciones que inactivan las dos nitrorreductas) fueron usadas como controles negativos.

La cepa RC1378 al poseer una inserción en la posición 101 del gen *mdaA*, el cual se encuentra por tanto, más lejano a la inserción presente en la cepa RC1497 (posición +214); sirve como punto de comparación para medir los efectos directos de la inserción.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11 donde se puede comparar la velocidad de oxidación de los cofactores utilizados por las nitrorreductas (NADH y NADPH), leídos a 340nm.

Tabla 11. Actividad de nitrorreducción

ACTIVIDAD ESPECÍFICA (Dada en $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$)					
CEPAS	RC1 (Wt) SnrA+ NfnB+	RC1378 NfnB+	RC1497* NfnB+	RC1503 SnrA+	RC1517 Doble mutante SnrA- NfnB -
NADPH	0.022287	0.008103	0.009262	0.038362	0.000546
NADH	0.011228	0.011988	0.011783	0.008931	0.004551

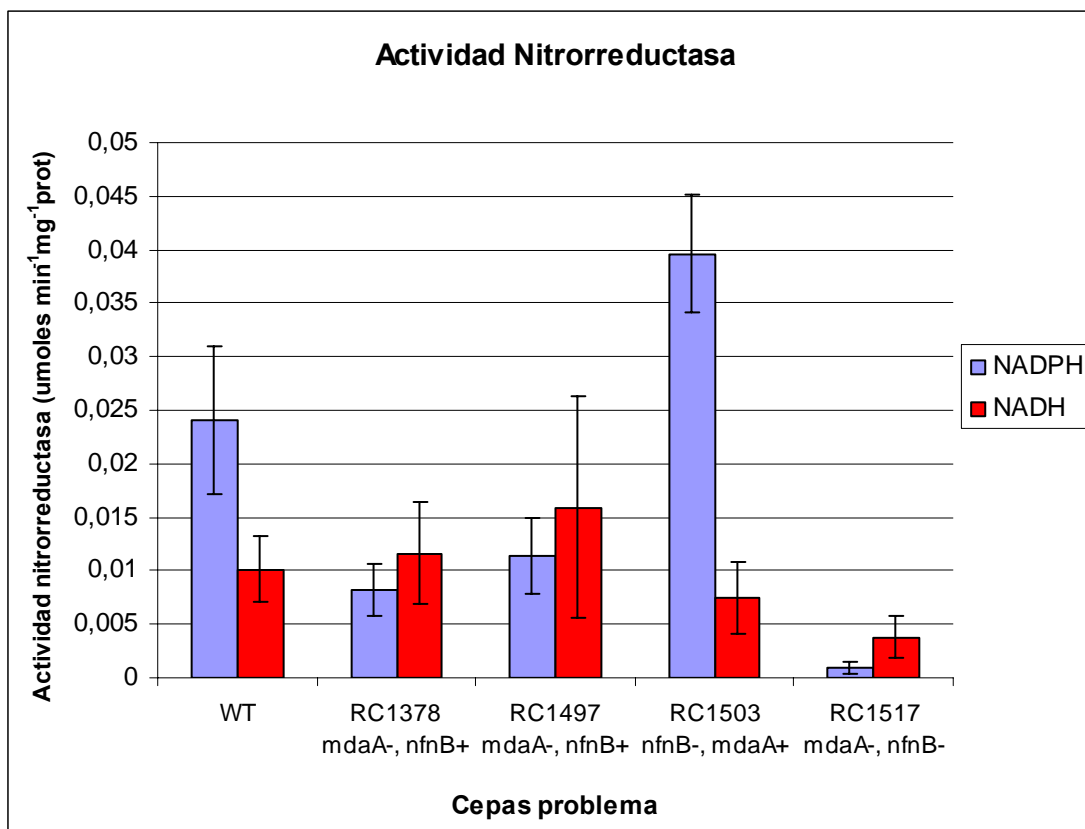


Figura 21. En la Figura se muestra la actividad de nitrorreducción presente en cinco diferentes cepas, el cual fue obtenido tras medir la oxidación de los cofactores NADH y NADPH

En la Figura 21 se puede observar de una manera más gráfica los resultados descritos en la Tabla 11. Puede observarse en la cepa WT RC1, la actividad de ambas nitrorreductasas reflejándose en la oxidación de NADH (utilizado como cofactor por NfnB y SnrA) en rojo y de NADPH (utilizado como cofactor NfnB) en azul. Las diferencias de actividad enzimática entre las cepas RC1378 y RC1497 no son significativas entre sí, por lo que se puede confirmar que el elemento Mud-Cam efectivamente se insertó en mdaA provocando la pérdida de función de la nitrorreductasa A (en la gráfica marcada como mdaA - nfnB+). Por otra parte la cepa RC1517, la cual posee un genotipo doble mutante ocasionado por inserciones en ambos genes, tanto mdaA como cnr, y por lo tanto ambas nitrorreductasas no tienen actividad. Sin embargo en el presente ensayo, al igual como en otros trabajos, como los de Salamanca-Pinzón y colaboradores (2006), se puede observar una actividad de nitrorreducción residual, la cual no corresponde a ninguna de las dos Nitrorreductasas descritas para *Salmonella*, por lo cual se interpreta como otro elemento con actividad de nitrorreducción, el cual posee una clara preferencia por el NADH como cofactor.

7. DISCUSIÓN

7.1 CONSTRUCCIÓN DEL INTERPOSÓN

Aunque se procuró que los eventos de transducción y el número de transductantes fueran más que suficientes para permitir la inserción del transposón Tn10dtet de forma azarosa para la construcción del interposón, los resultados obtenidos indican que existe otro factor que dificulta la inserción de dicho transposón.

Patrick y colaboradores (2003) reportaron que la inserción del transposón Tn10 presenta una preferencia no solo por secuencia, (debido a los extremos IS10 que caracterizan a los transposones) sino que al parecer depende de la forma estructural del DNA, es decir al reconocer la morfología del DNA necesaria para su inserción. En su trabajo encontraron que el transposón Tn10 tiene preferencias de inserción al reconocer una ligera curvatura en el DNA. Se cree que esta curvatura contribuye a la especificidad de inserción debido a que podría facilitar las primeras interacciones entre la transposasa y el sitio blanco, de tal forma que dicha curvatura pudiese incrementar de alguna forma el número de blancos en el DNA para la unión de la transposasa y de todo el complejo de transposición.

Se conoce también que la morfología del DNA es importante en otros sistemas de transposición tales como el de Mu, el cual se encuentra muy limitado por la especificidad de la secuencia de inserción y se ha observado que al mutar un único nucleótido en dicha secuencia, pierde la especificidad, aumentando su invasión de sitios blanco en el DNA, por lo que podría pensarse que dicho sistema también requiere del reconocimiento de una estructura o curvatura para la selección del sitio de transposición.⁵⁶ El transposón Tn7 posee un único sitio de inserción en el cromosoma de *E. coli*, para el cual requiere codificar la proteína TnsD, que se une a un sitio adyacente al sitio blanco del transposón, provocando una distorsión en el DNA que facilita el acoplamiento del transpososoma y la inserción del elemento.⁵⁶

Considerando que para la construcción del interposón, se partió de una cepa en la que previamente se había insertado un transposón Mud-Cam, la inserción de este elemento pudo modificar la morfología del DNA, de tal manera que la maquinaria de transposición del elemento Tn10d-tet no reconoció el sitio de inserción adecuado, es decir, en la etapa de inserción, la formación del transpososoma de Tn10d-tet y con ello la inserción no pudo obtenerse en el sitio esperado, sino hasta 6.88 kpb más adelante. Si el elemento Tn10d-tet, reconoce de manera muy específica una curvatura en el DNA, al existir una modificación estructural debido a la inserción del elemento Mud-Cam, esto debió fungir como un impedimento en el reconocimiento y ensamblaje adecuado de la maquinaria del transpososoma de Tn10d-tet, evitando con ello la construcción del interposón.

Es recomendable por tanto para la construcción de esta herramienta, tomar en cuenta las dificultades para su construcción por esta vía genética, y quizás considerar la construcción por métodos moleculares, como ligamento de la resistencia a tetraciclina por medio de enzimas, y la posterior transformación de los candidatos en cuestión, con el fin de crear una herramienta que permita facilitar el mapeo de las cepas en cuestión, o de otras, en conjunción con el mapeo físico con electroforesis de campo pulsado.

7.2 DETERMINACIÓN DEL CMI

Este ensayo permitió correlacionar la presencia del transposón Mud-Cam, con la resistencia al antibiótico Nitrofurantoína en 10 cepas de las 23 construidas en un principio, las cuales presentaron resistencia tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis, permitiéndonos delimitar el grupo de búsqueda a analizar.

De la misma forma nos permitió observar otros fenómenos interesantes en 8 cepas analizadas. Cabe destacar que en 6 de las cepas analizadas se observó una mayor resistencia a la Nitrofurantoína doblando el CMI de la cepa silvestre (WT) en alguna de las dos condiciones analizadas (aerobiosis o anaerobiosis), y en la otra lo igualaron (su CMI era igual al de la cepa WT). Dos cepas más, la RC1486 y la RC1502 resultaron ser más sensibles que la cepa silvestre en condiciones de anaerobiosis. Lo cual indica que el transposón pudo haberse insertado en algún gen que pudiese estar involucrado con su modo de vida libre o en el tracto intestinal.

Por otra parte se encontraron 3 cepas (RC1501, RC1504 y RC1507) las cuales resultaron tener un CMI inferior al de la cepa silvestre en ambas condiciones (aerobiosis y anaerobiosis), lo que nos indica que el transposón pudo haber afectado algún gen no vital que pudiera predisponerlas a la entrada del antibiótico o incluso a una sobre expresión de las enzimas involucradas en la metabolización de dicho antibiótico (Nitrofurantoína). Por lo que su análisis futuro podría ser de interés para el estudio de dichas enzimas.

7.3 MAPEO POR COTRANSDUCCIÓN Y PCR

El mapeo por coeficientes de cotransducción nos permitió elegir de entre las cepas seleccionadas con base en su CMI, a aquellas en las que la distancia entre los dos elementos insertos fuese mínima; facilitando de esta manera la posibilidad de utilizar dos diferentes herramientas para mapear. El mapeo por PCR entre dos elementos cercanos y la del PFGE (Geles de electroforesis de campo pulsado).

El mapeo entre estos dos elementos se realizó explorando una amplia variedad de condiciones de PCR, hasta que finalmente se obtuvo la amplificación. Sin embargo no pudieron obtenerse las condiciones de reamplificación del producto de PCR. Tomando en cuenta que la distancia promedio aproximada entre los elementos es de 2.2 y 3.45kpb para las cepas e10 y f1 respectivamente, dicha distancia entre los marcadores, aunque se encuentra dentro del rango de amplificación de la PCR, dificultó la obtención de resultados favorables que pudiesen haber conducido a la obtención de la secuencia que nos permitiera ubicar el sitio de inserción del transposón.

Por lo que se recomienda el uso de esta estrategia para el mapeo entre inserciones cuya distancia entre los dos elementos sea menor, con base en la experiencia aquí reportada; se recomienda que sean menores a 2kpb de distancia entre los mismos.

7.4 MAPEO POR PFGE

El método de mapeo usando geles de electroforesis de campo pulsado (PFGE) es un método que permite un mapeo físico rápido y la visualización de áreas del DNA cortado por las enzimas. En un principio las ventajas de esta metodología motivaron la construcción del interposón, sin embargo, debido al fracaso en su elaboración, se optó por utilizar aquellas cepas en las cuales los coeficientes de cotransducción indicaban una mayor cercanía entre los elementos transponibles. Por desgracia, como estos experimentos se realizaron en su mayoría de forma simultánea, de los candidatos utilizados en esta metodología, dos fueron descartados y sólo se obtuvieron resultados en uno de los mismos (F1***). Sin embargo, no fue posible encontrar las condiciones para visualizar la banda desaparecida.

Esta metodología aporta grandes ventajas, sin embargo la dificultad que enmarca, reside en encontrar las condiciones favorables para la separación y visualización de bandas de diferentes pesos, en especial de aquellas de menor tamaño. De haber sido posible la construcción del interposón, hubiese sido plausible el seguir explorando las condiciones de visualización de las bandas, sin embargo, al solo contar con una cepa en la cual los elementos se encontraban aproximadamente a 3.45kpb entre ellos, reducía la posibilidad de obtener resultados favorables, por lo que se decidió enfocar la búsqueda en aquellas estrategias en las que se obtuvieron resultados positivos sin necesidad de depender del fallido interposón.

Se recomienda el uso de esta estrategia de mapeo para trabajos posteriores con cepas que cuenten con elementos insertos con pocos sitios de restricción, o elementos con marcador selectivo para tetraciclina. Existen en la literatura múltiples ejemplos de trabajos de mapeo genético en bacterias apoyado por mapeo físico con electroforesis de campo pulsado,^{19,21,35} con lo cual se reitera nuevamente la factibilidad de esta metodología, como una opción viable.

7.5 MAPEO POR PCR SEMIALEATORIO

El método de mapeo por PCR semialeatorio de dos pasos, desarrollado por Chun y colaboradores en 1999, es un método por medio del cual es posible el mapeo de secuencias genómicas que se encuentran flanqueando un elemento inserto cuya secuencia se conoce. El principio se basa en oligonucleótidos de anclaje semialeatorio en el genoma, junto con oligonucleótidos diseñados para la secuencia específica del elemento inserto y su posterior reamplificación utilizando oligonucleótidos específicos, tanto los diseñados para la secuencia inserta, como otros diseñados específicamente para la detección del extremo 5' no degenerado ubicado al interior de los oligonucleótidos degenerados.¹²

Como antecedentes existen otros trabajos reportados sobre mapeo, utilizando PCR semialeatorio en los cuales se ha probado la efectividad de dicho método tanto en levaduras¹⁸ como en bacterias tales como *Salmonella*.¹²

Así mismo, en el presente trabajo se pudieron obtener resultados satisfactorios permitiendo el mapeo de dos de las inserciones (RC1488 y RC1507), por lo que juzgando los resultados obtenidos, el método de PCR semialeatorio se considera el más adecuado dadas las condiciones de la búsqueda y que no requiere de la inserción de un elemento adicional

(otro transposón como Tn10) que pudiese modificar aún más la morfología del DNA, produciendo dificultades adicionales. Arrojando así que una de las inserciones del transposón se encontró asociada a la posición +214 cercana al extremo carboxilo del gen *mdaA* correspondiente a la nitrorreductasa A de *Salmonella typhimurium* y otro en una región intergénica del operón del transportador ABC de glutamina.

7.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Originalmente la cepa RC1378⁶³ presenta una inserción de un transposón T-POP en la posición 101, ocasionando la interrupción del gen *mdaA*, lo que puede evidenciarse en la detección única de la actividad enzimática de NfnB, producto del gen *cnr*. La cepa 1497, en la cual se realizó mutagénesis por transposición, usando el elemento Mud-Cam, el cual tras mapearse se encontró ubicado en la posición +214 del gen *mdaA*, presentó una actividad de nitrorreducción equivalente a la presentada por la cepa *mdaA*- RC1378. Por lo que el ensayo de actividad que se realizó con la finalidad de corroborar la inserción del transposón en *NfsA* y comparar el efecto de la inserción, nos permitió correlacionar la inserción del transposón Mud-Cam con el fenotipo de resistencia a Nitrofurantoína. Así mismo en dicho ensayo también pudo observarse cómo en la cepa RC1517 (doble mutante) existe la presencia de actividad de nitrorreducción basal con preferencia al uso de NADH como cofactor, lo cual es considerado por McCalla y colaboradores como un indicio de la posible existencia de una tercera enzima con actividad nitrorreductasa en *Salmonella typhimurium*.

El gen *mdaA* codifica para la expresión de la nitrorreductasa A, como ya se había mencionado, esta constituye aproximadamente el 80% de la actividad de nitrorreducción presente en *E. coli* y es probablemente una de las nitrorreductasas insensibles al oxígeno más conocidas.

Una de las características más importantes de este tipo de enzimas es la presencia del Flavinmononucleótido, el cual es utilizado como cofactor, para llevar a cabo la reducción de sus diferentes sustratos mediante la transferencia de electrones mediada por el ya mencionado cofactor. Estructuralmente hablando, esta enzima es un homodímero de aproximadamente 54kDa, la cual está conformada por 12 hélices α y 5 hojas β .⁴⁴ Se caracteriza por poseer un Flavinmononucleótido (FMN) por cada monómero de proteína, los cuales se sitúan en la parte interna del dímero en una concavidad formada por el ensamble de las dos subunidades.⁵⁵ De acuerdo con Parkinson y colaboradores (2000), existen cinco regiones altamente conservadas, las cuales se encuentran implicadas con la unión al FMN y con ello relacionadas a la actividad catalítica de la enzima. Uno de estos puntos, lo conforman los residuos del carboxilo terminal del segundo monómero, específicamente Arg207 y Lys205, los cuales interactúan con el grupo fosfato del FMN del primer monómero, garantizando así la conformación del homodímero; hay que destacar que el plegamiento de estas enzimas comienza por el extremo carboxilo terminal.⁴⁴

Puesto que la ubicación del transposón se encontraba cercano al extremo carboxilo del gen (a 25 codones del extremo carboxilo interrumpiendo el codón de histidina de la hélice α J), y considerando que el extremo carboxilo es el sitio inicial de plegamiento de estas enzimas, así como uno de los sitios más importantes involucrado con la unión del dímero al sitio catalítico de la enzima, es de esperar que la inserción de un elemento transponible

propiciara el fenotipo de resistencia a Nitrofurantoína, a causa de la inactivación de una de las nitrorreductasas más activas presentes en *Salmonella typhimurium*.

7.7 EL TRANSPORTADOR ABC

Gracias al método de PCR anidado, fue posible obtener la ubicación de la inserción del transposón Mud-Cam en la cepa RC1488, la cual se localizó en la secuencia intergénica ubicada entre los genes *glnP* y *glnH* en la posición 896218, (ubicada a 86pb del sitio de unión ribosomal del gen *glnP* y a 46pb del gen *glnH*). Dichos genes (*glnH* y *glnP*) codifican para subunidades del transportador ABC de glutamina. Los transportadores ABC (adenosine triphosphate-binding cassette) son sistemas de secreción translocadores los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en organismos bacterianos, tanto monodérmicos (Gram positivos), como en los didérmicos (Gram negativos).⁸³

Los transportadores ABC forman parte de un grupo de proteínas llamadas proteínas ABC, las cuales se caracterizan por poseer un casete de unión a ATP (adenosine triphosphate-binding cassette o dominio ABC-ATPase) el cual está involucrado en el acoplamiento de energía producto de la hidrólisis del ATP. Los transportadores ABC poseen dos componentes más que se encuentran asociados al anterior, una proteína accesoria encargada de la captura del ligando y que se encarga de pasarlo al componente translocador y un dominio hidrofóbico transmembranal el cual en la mayoría de los transportadores ABC, consta de seis segmentos transmembranales formados por α -hélices putativas.⁸³

Los transportadores ABC son mejor conocidos por llevar a cabo transporte biológico a través de membranas (transporte activo) de muchos diferentes tipos de compuestos, así como de importar pequeños solutos. La especificidad por dichos solutos reside en la proteína de unión, por ejemplo *HisJ* (del transportador ABC de Histidina) es requerida para la toma de histidina extracelular.⁸³

En *E. coli*, *S. typhimurium* y *K. aerogenes* existen al menos dos sistemas independientes que se ocupan del transporte de glutamina al interior de la célula, los cuales pueden distinguirse por su afinidad por la glutamina. Un sistema de canal de glutamato el cual presenta baja afinidad por la glutamina y solo puede detectarse en ausencia del sistema de alta afinidad; dicho sistema (alta afinidad) lo conforma el transportador ABC de Glutamina codificado por el operón *gln HPQ*, este sistema posee una proteína de unión periplasmática, la cual es muy específica para la glutamina.⁵¹

La transcripción de *gln HPQ* genera tres proteínas correspondientes a la proteína *GlnH* que conforma la subunidad de unión a glutamina del transportador ABC, *GlnP* conforma la proteína de membrana del transportador y finalmente *GlnQ* la cual corresponde a la subunidad de unión a ATP.

Es sabido que este tipo de bombas de eflujo pueden ser específicas de un sustrato o podrían transportar una variedad de compuestos con similitudes estructurales (incluyendo antibióticos de múltiples clases), algunas de estas bombas de eflujo han sido asociadas a la resistencia múltiple a drogas (MDR).⁵⁹ Dicha resistencia puede asociarse a mutaciones que aumentan la expresión de estos transportadores aumentando consigo la exportación de dichas sustancias, expulsándolas del ambiente intracelular antes de provocar algún efecto en las bacterias. En otros casos, mutaciones en los genes de estas bombas pueden ocasionar

la subexpresión de los transportadores teniendo como consecuencia la disminución en la importación de antimicrobianos y con ello la resistencia al agente en cuestión.⁵⁹

Como ejemplo puede citarse el de LmrA de *Lactococcus lactis*, el cual es un transportador ABC que le confiere resistencia a múltiples tipos de drogas.⁷⁴

Debido a que la inserción de Mud-Cam se encuentra en una región intergénica de glnP y glnH, y considerando que estos dos genes, junto con glnQ forman el operón glnHPQ, la inserción del transposón podría estar propiciando un efecto polar, lo cual podría verse reflejado sobre la expresión del operón, de tal forma que esta podría verse gravemente disminuida o incluso anulada por completo. De esta forma al asociar el efecto sobre el transposón con la resistencia a la Nitrofurantoína presente en esta cepa, puede deducirse que al no sintetizarse transportadores ABC el antibiótico Nitrofurantoína no está ingresando a la célula, de tal forma que adquiere resistencia al antibiótico en cuestión.

De esta forma se propone el estudio de este transportador y de la cepa para así poder constatar que la Nitrofurantoína no está ingresando al interior de la bacteria. Además, valdría la pena estudiar la afinidad de dicho transportador por la Nitrofurantoína, ya que no existen trabajos que relacionen al transportador ABC de glutamina en bacterias gram negativas con el transporte de algún antibiótico y estructuralmente hablando no existe parecido entre la glutamina y la Nitrofurantoína. Por lo que el presente trabajo podría abrir la pauta para describir un nuevo mecanismo de resistencia asociada al transportador ABC de glutamina. El trabajo de tesis de Burgos (2003), en el cual se reporta también la resistencia al mismo antibiótico (NFN) al mutar un URF con dominios de transportador transmembranal tipo ABC, podría sugerir con más fuerza la importancia de realizar estudios sobre este tópico.

8. CONCLUSIONES

- Se efectuó la construcción de 23 cepas resistentes a Nitrofurantoína de *Salmonella enterica serovar typhimurium LT2* mediante mutagénesis por inserción del elemento transponible Mud-Cam.
- No fue posible la construcción del interposón, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que existe otro factor que dificulta la inserción del transposón Tn10d-tet en el elemento Mud-Cam, limitando dicha inserción a zonas cercanas.
- La cepa 1517 fue identificada como portadora de la inserción Mud-Cam en la posición +214 del gen *mdaA* (nitrorreductasa A) y se corroboró mediante un ensayo de actividad con la cepa RC1378.
- En la cepa 1488 fue identificada la inserción del elemento Mud-Cam en la posición 896218 ubicada en la región intergénica entre *gln H* y *gln P*, pertenecientes al operón *gln HPQ*, codificante del transportador dependiente de energía (transportador ABC) con afinidad para el transporte de glutamina.
- La inserción en la posición 896218 del operon *gln HPQ* en la cepa RC1488 fue correlacionada con el fenotipo de resistencia a Nitrofurantoína como un posible efecto polar ocasionado por la inserción del elemento Mud-Cam, quedando como perspectivas del presente trabajo el estudio de dicho transportador.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Anand R., and Southern, E.M. 1990. *Pulsed field gel electrophoresis. In Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach.* (D. Rickwood and B.D. Hames, eds.), pp. 101- 123. IRL Press at Oxford University Press, New York.
2. Andrews M.J. 2001. *Determination of Minimum Inhibitory Concentration.* J Antimicrob Chemother 2001; 48(Suppl 31): 5-16.
3. Asche C., Dumy P., Carrez D., Croisy A., and M. Demeunynck. 2006. *Nitrobenzylcarbamate prodrugs of cytotoxic acridines for potential use with nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy.* Bioorg Med Chem Lett. 16: 1990-1994
4. Aufrere Michel B., Hoener Betty-Ann, and Mary Vore. 1978. *Reductive metabolism of nitrofurantoin in the rat.* Drug metabolism and disposition. 1978 6:4 403-411
5. Barbosa M. and S. Levy. 2002. *Activation of the Escherichia coli nfnB gene by MarA through a highly divergent marxbox in a class II promoter.* Molecular Microbiology. 45:191-202
6. Birren, B., and Lai, E. 1993. *Pulsed field electrophoresis: A practical guide.* Academic Press, San Diego
7. Blattner F.R., Plunkett III G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayher G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau G. and Y. Shao. 1997. *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12.* Science 227:1453-1462
8. Bruijn F., Lupski J. and G. Weinstock. 1997. *Bacterial genomes. Physical Structure and Analysis.* USA. Chapman and Hall. pp. 30-37
9. Brunmark A., Cadenas E., Segura A. J., Lind C. and L. Ernster. 1988 *Free Radic. Biol. Med.* 5, 133–143. (Citado en Watanabe, 1998).
10. Bryant C., and M. DeLuca. 1991 *J. Biol. Chem.* 266, 4119–4125. (Citado en Watanabe, 1998).
11. Bryant D.W., McCalla D.R., Leeksa M. and P. Laneuville. *Tipe I nitroreductases of Escherichia coli.* 1981. Can. J. Microbiol. 27: 81-86
12. Burgos Cháidez R.M. 2003. Identificación de genes relacionados con la resistencia a Nitrofurantoina en Salmonella enterica. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM.
13. Cabrerizo S., Ballesteros I., Herrero T. and M. de Barrio. 2005. *Hipersensibilidad a los nitrofuranos.* Alergol Inmunol Clin 2005; 20: 81-83
14. Carroll C., Warnakulasuriyarachchi D., Nokhbeh M. and I. Lambert I. 2002 *Salmonella typhimurium mutagenicity tester strains that overexpress oxygen-insensitive nitroreductases nfsA and nfsB.* Mutat. Res. 501, 79–98. (Citado en Salamanca-Pinzón, 2006).
15. Chen DK, McGeer A, de Azavedo JC and DE Low. *Decreased susceptibility of Streptococcus pneumoniae to fluoroquinolones in Canadá.* N. Engl. J. Med. 1999; 341: 233-239
16. Chu, G., Vollrath, D., and Davis, R.W. 1986. *Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields.* Science: 234, 1582-1585.

17. Chu, G. 1990. Pulsed-field electrophoresis: theory and practice. En *Methods: A Companion to Methods of Enzymology. Pulsed-Field Electrophoresis* (B. Birren and E. Lai, eds.), Vol. 1, No. 2, pp. 129-142. Academic Press, San Diego.
18. Chun C., Edenberg H.J., Kelley M. R. and M.G. Goebel. 1999. *Rapid amplification of Uncharacterized Transposon tagged DNA Secuences from Genomic DNA*. Yeast Functional Analisis Reports. 13: 233-240
19. Dally E.L., Barros T.S., Zhao Y., Lin S., Roe B.A. and R.E Davis. 2006. *Physical and genetic map of the Spiroplasma kunkelii CR2-3x chromosome*. Can J Mricobiol. 52(9):857-67.
20. Di M. D., Ross D., Bellomo G., Eklow L. and S. Orrenius. 1984. *Arch. Biochem. Biophys.* 235, 334–342. (Citado en Watanabe, 1998).
21. Dordet-Frisoni E., Talon R. and S. Leroy. 2007. *Physical and genetic map of the Staphylococcus xylosus C2a chromosome*. FEMS Microbiol Lett. 266(2):184-93
22. Drlica K and X. Zhao. *DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones*. Microbiol Mol Biol Rev. 1997; 61:377–392. (Citado en Fred, 2006)
23. Ecker, J. 1990. *PFGE and YAC analysis of the Arabidopsis genome*. In *Methods: A Companion to Methods of Enzymology. PulsedField Electrophoresis* (B. Birren and E. Lai, eds.), Vol. 1, No. 2, pp. 186-194. Academic Press, San Diego.
24. Elia M.C., DeLuca J.G., and M.O. Bradley. 1991. *Significance and measurement of DNA double strand breaks in mammalian cells*. Pharmacology & Therapeutics 51, pp. 291-327.
25. Esteve-Nuñez A., Caballero A. and Ramos J.L. 2001. *Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65: 335-352
26. Field J.A. 2002. *Limits and anaerobic degradation*. Water Sci. Technol. 45: 9-18
27. Fortino Solórzano-Santos y Ma. Guadalupe Miranda-Novales. *Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos*. Salud pública Méx vol.40 n.6. 1998
28. Fred C. Tenover. *Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria*. The American Journal of Medicine (2006) Vol 119 (6A), S3–S10
29. French C., Nicklin S. and N.C. Bruce. 1998. *Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by Enterobacter cloacae PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase*. Applied and Environmental Microbiology. 64: 2864-2868
30. Gerk P.M., Kuhn R.J., Desai N.S., and P.J. McNamara. 2001. *Active transport of nitrofurantoin into human milk*. Pharmacotherapy 21:669–675. (Citado en Merino, 2005).
31. Goldmann DA, Huskins WC. *Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: A strategic priority for hospitals worldwide*. Clin Infect Dis 1997;24 Suppl 1:S139-S145. (Citado en Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 1998).
32. Gonzales R, Malone DC, Maselli JH, Sande MA. *Excessive antibiotic use for acute respiratory infections in the United States*. Clin Infect Dis. 2001; 33:757–762. (Citado en Fihman, 2006).
33. Goodman D.R., Hakkinen P.J., Nemenzo J.H., and M. Yore. 1977. *Muzat. Res.* 48, 295 (1977). (Citado en Aufrere, 1978).
34. Guegen E., Rousseau P., Duval-Valentin G. and M. Chandler. 2005. *The transpososome: control of transposition at the level of catalysis*. TRENDS in Microbiology. Vol.13 No. 11: 543-549

35. Guerra B., Junker E., Miko A., Helmuth R. and M.C. Mendoza. 2004. *Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying Salmonella enterica serotype Typhimurium strains*. Microb. Drug Resist. 10(2):83-91
36. Guerra Contreras Rubén. *Receta de mercado*. Instituto Mexicano de Ejecutivos de Finanzas S.C. 01/02/2006. Núm.3806
37. Hamer L., DeZwaan T.M., Montenegro-Chamorro M.V., Frank S.A. and J. E. Hamer. 2001. *Recent advances in large-scale transposon mutagenesis*. Curr. Opin. in Chem. Biol., 5: 67-73
38. Kang W.K., Icho T., Isono S., Kitakawa M. and K. Isono. 1989. *Characterization of the gene rimK responsible for the addition of glutamic acid to the C-terminus of ribosomal protein S6 in Escherichia coli K-12*. Mol. Gen. Genet. 217:281-288.
39. Kari F.W., Weaver R., and Neville M.C. 1997. *Active transport of nitrofurantoin across the mammary epithelium in vivo*. J Pharmacol Exp Ther 280:664–668. (Citado en Merino, 2005).
40. Kislak JW, Eickhoff TC, Finland M. *Hospital-acquired infections and antibiotic usage in the Boston City Hospital—January, 1964*. N Engl. J. Med. 1964; 271:834–835. (Citado en Fihman, 2006)
41. Kleckner N., Bender J. and S. Gottesman. 1991. *Uses of transposons with emphasis on Tn10*. Methods Enzymol. 204: 139-180. (Citado en Rappleye and Roth, 1997)
42. Knox R.J., Friedlos F., Sherwood R.F., Melton R.G. and G.M. Anlezark. 1992. *The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954). Purification of properties of a nitroreductase enzyme from Escherichia coli a potential enzyme for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)*. Biochem. Pharm. 44: 2297-2301
43. Liochev S.I., Hausladen A. and I. Fridovich. 1999. *Nitroreductase A is regulated as a member of the soxRS regulon of Escherichia coli*. Biochemistry. 96: 3537-3539
44. Lovering A.L., Hyde E.I., Sarle P.F. and S.A. White. 2001. *The structure of Escherichia coli nitroreductase complexed with nicotinic acid: three crystal forms at 1.7 Å, 1.8 Å and 2.4 Å resolution*. Journal of Molecular Biology. 309: 203-213
45. Marr J.J., Moffet H.L., Kunin C.M. 1988. *Guidelines for improving the use of antimicrobial agents in hospitals: a statement by the Infectious Diseases Society of America*. J Infect Dis. 1988; 157:869–876. (Citado en Fihman, 2006).
46. McCalla D.R., Kaiser C., Green M.H.L. 1997. *Genetics of nitrofurazone resistance in Escherichia coli*. J Bacteriol. 1978. 133: 10–16.
47. McManus. 1997. *Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents*. Am. J. Health Syst Pharm. 1997; 54:1420 –1433. (Citado en Fred, 2006).
48. Merino G., Jonker J. W., Wagenaar Els, van Herwaarden A. E., and Alfred H. Schinkel. 2005. *The Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) Affects pharmacokinetics, Hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic Nitrofurantoi*. Mol Pharmacol 67:1758–1764, 2005
49. Michael N.P., Brehm J.K., Alezark G.M. and N.P. Minton. 1994. *Physical characterization of the Escherichia coli B gene encoding nitroreductase and its over-expression in Escherichia coli K12*. FEMS Microbiol. Lett. 124:195-202.
50. Morrison H., Jernstrom B., Nordenskjold M., Thor H. and S. Orrenius. 1984 *Biochem. Pharmacol.* 33, 1763–1769. (Citado en Watanabe, 1998).

51. Neidhardt F.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Resnikoff W.S., Riley M., Schaechter M. and H.E. Umbarger. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and Molecular Biology*. Segunda Edición. Vol. I. ASM Press, Washington, D.C. pp. 360, 386
52. Neil Fishman, MD. 2006. *Antimicrobial Stewardship*. The American Journal of Medicine (2006) Vol 119 (6A), S53–S61
53. Nokhbeh M., Boroumandi S., Pokorny N., Koziarz P., Paterson E. and I. Lambert. 2002. *Identification and characterization of SnrA, an inducible oxygen-insensitive nitroreductase in Salmonella enterica serovar Typhimurium TA 1535*. Mutat. Res., 508, 59–70. (Citado en Salamanca-Pinzón, 2006).
54. Office of Technology Assessment USC. *Impacts of Antibiotic-Resistant Bacteria*. OTA-H-629. Washington, DC: Government Printing Office, 1995. (Citado en Fihman, 2006).
55. Parkinson G.N., Skelly J.V. and Stephen Neidle. 2000. *Crystal Structure of FMN-Dependent Nitroreductase from Escherichia coli B: A Prodrug-Activating Enzyme*. J. Med. Chem. 2000, 43, 3624-3631
56. Patrick A. Pribil and David B. Haniford. 2003. *Target DNA Bending is an Important Specificity Determinant in target site selection in Tn10 Transposition*. J. Mol. Biol. (2003) 330: 247-259
57. Payne D., Tomasz A. *The challenge of antibiotic resistant bacterial pathogens: the medical need, the market and prospects for new antimicrobial agents*. Curr Opin Microbiol. 2004; 7:435– 438. (Citado en Fihman, 2006)
58. Petri W.A.J. *Antimicrobial agents: sulfonamides, trimethoprim-sulfamethoxazole, quinolones, and agents for urinary tract infections*. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, eds. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2006; 1111–1126. (Citado en Fred, 2006)
59. Piddock Laura J.V. 2006. *Clinical relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria*. Clinical Microbiology Reviews. 19: 382-40
60. Race P.R., Lovering A.L., Green R.M., Ossor A., White S.A., Searle F.P., Wrighton C.J. and E. Hyde. 2005. *Structural and mechanistic studies of Escherichia coli nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone: reversed binding orientations in different redox states of the enzyme*. J. Biol. Chem., 280, 13256–13264. (Citado en Salamanca-Pinzón et al., 2006)
61. Reimann H.A., D'Ambola J. *The use and cost of antimicrobics in hospitals*. Arch Environ Health. 1966; 13:631– 636. (Citado en Fihman, 2006)
62. Reppleye Chad A. and John R. Roth. 1997. *A Tn10 Derivative (T-POP) for Isolation of insertions with conditional (Tetracycline-Dependent) Phenotypes*. J. Bac. 179 (18): 5827-5834.
63. Salamanca-Pinzón S.G., Camacho-Carranza R., Hernández-Ojeda S.L. and J.J. Espinosa-Aguirre. 2006. *Nitrocompound activation by cell-free extracts of nitroreductase-proficient Salmonella typhimurium strains*. Mutagenesis vol. 21 no. 6 pp. 369–374, 2006
64. Sambrook J., Fritsch E.F. and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2da. Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. USA.

65. Santos J.I., De la Maza L., Tanaka J. *Antimicrobial susceptibility of selected bacterial enteropathogens in Latin America and Worldwide*. Scand J Gastroenterol 1989;24 suppl 169:28-33. (Citado en Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 1998)
66. Schmieger L. 1971. *A method for detection of phage mutants with altered transducing activity*. Molecular and General Genetics. 410: 378-381 (Citado en Burgos, 2003)
67. Shu-Lin Liu and Kenneth E. Sanderson. 1995. *I-CeuI Reveals Conservation of the Genome of Independent Strains of Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol.: June 1995 Vol. 177, No. 11 (3355-3357)
68. Solórzano S.F., Leños M.B., Guiscafré G.H. *Resistencia antimicrobiana actual de Salmonella typhi, Salmonella enteritidis y Shigella sp.* Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 1987; 44:448-455. (Citado en Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 1998)
69. Spain J. 1995. *Biodegradation of nitroaromatic compounds*. Annu. Rev. Microbiol., 49, 523–555. (Citado en Salamanca-Pinzón et al., 2006)
70. Thornton M. J., Smith B. A., Beland F. A. and R. H. Heflich. 1991. *Carcinogenesis*. 12, 2317–2323. (Citado en Watanabe, 1998).
71. Thomson CJ, Power E, Ruebsamen-Waigmann H, Labischinski H. *Antibacterial research and development in the 21st century—an industry perspective of the challenges*. Curr Opin Microbiol. 2004; 7:445–450. (Citado en Fihman, 2006)
72. Towson S.M., Boreham P.F.L., Upcroft P. and J.A. Upcroft. 1994. *Resistance to the nitroheterocyclics drugs*. Acta. Trop., 56, 173–194. (Citado en Salamanca-Pinzón et al., 2006)
73. Turmel Chantal and Jaan Noolandi. 1993. *Effect of one-dimensional pulsed-field gel electrophoresis on linear and circular DNA*. Electrophoresis., 14, 304-312
74. Van Veen, H. W., Venema K., Bolhuis H., Oussenko I., Kok J., Poolman B., Driessen A. J., and W. N. Konings. 1996. *Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDRI*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 10668-10672 (citado en Piddock, 2006)
75. Wang C. Y., Muraoka K., and G. T. Bryan. 1975. *Cancer Res.* 25, 3611 (1975). (Citado en Aufrere, 1978).
76. Watanabe M., Nishino T., Takio K., Sofuni T. and T. Nohmi. 1998. *Purification and Characterization of Wild-type and Mutant “Clasical” Nitroreductases of Salmonella typhimurium*. The journal of Biochemical Chemistry. Vol. 273, No. 37: 23922-23928
77. Weber JT, Courvalin P. *An emptying quiver: antimicrobial drugs and resistance*. Emerg Infect Dis. 2005; 11:791–793. (Citado en Fihman, 2006)
78. Whiteway J., Koziarz P., Veall J., Sandhu N., Kumar P., Hoecher B. and I. Lambert. 1998. *Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of SnrA and Cnr in development of resistance to 5-Nitrofuran derivates in Escherichia coli*. J. Bacteriol., 180, 5529–5539. (Citado en Salamanca-Pinzón et al., 2006)
79. Wu T.T. 1966. *A model for tree-point análisis of random general transduction*. Genetics. 54:405-510.
80. www.ncbi.nih.gov/PubMed.html
81. Yahagi T., Matsushima T., Nagao M., Seino Y., Sugiyama T., and G. T. Bryan. 1976. *Mutat. Res.* 40, 9 (1976). (Citado en Aufrere, 1978).

82. Yao J and RJ Moellering. Antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover MC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2003:1039–1073. (Citado en Fred, 2006)
83. Young Joanne and I. Barry Hollard. 1999. *ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1461 : 177-200
84. Zenno S., Koike H., Kumar A.N., Jayaraman R., Tanokura M. and K. Saigo. 1996. *Biochemical Characterization of NfsA, the Escherichia coli major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a Vibrio harveyi flavin oxidoreductase*. *J. Bacteriol.*, 178:4508–4514. (Citado en Salamanca-Pinzón, 2006).

10. ANEXO

Tn10

Tn10 es un transposon compuesto que se transpone por medio de un mecanismo no-replicativo, es decir el transposon está físicamente escindido del replicón del DNA donador, está insertado en la molécula recipiente, y requiere sólo de la síntesis de DNA para llenar los gaps en los extremos entre el transposon y la molécula recipiente.⁸

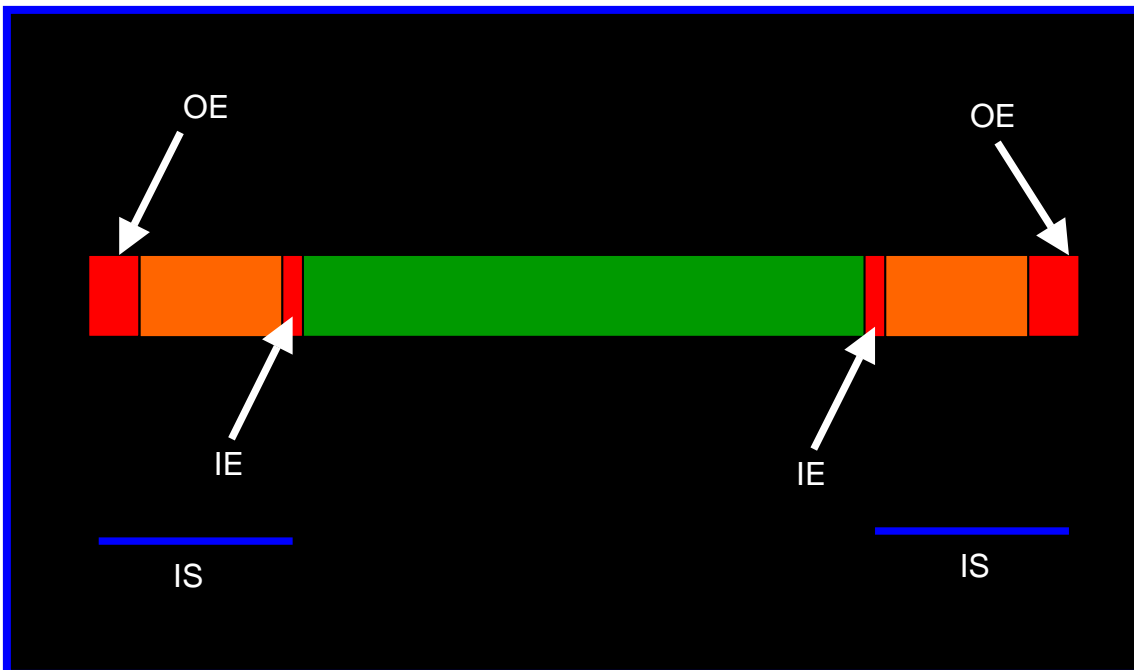


Figura 22. En esta imagen se representa la estructura básica del Transposon Tn10.

IS “Secuencias de Inserción” ; IE “Inside Extreme” ; OE “Outside Extreme”

El transposon Tn10 se encuentra flanqueado en sus extremos por dos secuencias repetidas invertidas denominadas “Secuencias de Inserción o extremos IS”, estas secuencias IS juegan un papel muy importante para el reconocimiento del sitio de inserción del transposon, ya que poseen a su vez dos extremos, uno flanquea el extremo del transposon y es denominado “Extremo Exterior o OE” (Outside Extreme); el segundo extremo de la secuencia de inserción se denomina “Extremo Interno o IE” (Inside Extreme) y como su nombre lo indica este colinda con la secuencia central del transposon.³⁴ Ver Figura 22.

Tanto el IE como el OE poseen secuencias repetidas de 23pb de las cuales 10-15pb permiten la unión de la Transposasa al OE, mientras que en otra secuencia de 2-3pb se encuentra el sitio de corte de la Transposasa.³⁴

Estos extremos, al interactuar con la transposasa y algunos factores del hospedero puede conformarse el mecanismo de transposición, a este complejo de nucleoproteínas-DNA se le denomina Transpososoma. Este se encarga de la movilización del transposon y realiza el corte del DNA para transferir el transposon al hospedero.³⁴ Patrick A. Pribil and David B. Haniford en el 2003, describieron que el mecanismo de incorporación del transpososoma y por tanto el de inserción del transposon *Tn10* provoca una deformación considerable en el DNA blanco, de tal forma que la formación de dicha estructura, al igual que los extremos IS son determinantes para la selección del sitio de inserción de *Tn10*.

El mapa genético de *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium es un organismo procarionte gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Este organismo es conocido por ocasionar una enfermedad en ratones cuyo cuadro clínico es similar al de la tifoidea. Su cromosoma posee un tamaño de 4857432pb (\cong 4.9Mpb), su mapa genético fue publicado en 1995, en el que se enlistan 1160 genes; 1081 de los cuales se ubican en el cromosoma circular y 29 en el plasmido de pSLT de 90 kb; dicho plasmido se encuentra invariablemente en todas las líneas LT2; los restantes 50 genes aún no han sido mapeados, por lo que aun se desconoce su función.

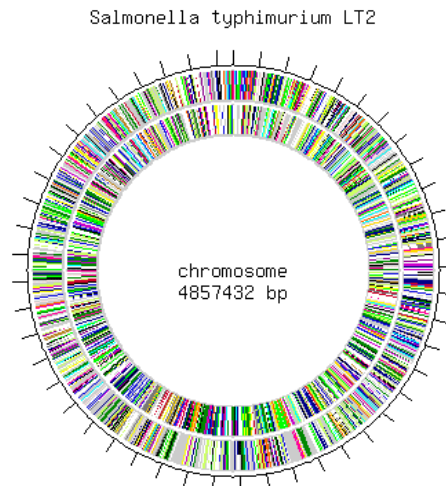


Figura 23. Genoma completo de *Salmonella typhimurium* LT2 secuenciado. Datos almacenados en la Washington University School of Medicine 13 de Enero de 2006.