



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Detección de la transferencia horizontal de genes *in vivo*
utilizando herramientas de biología sintética.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L Ó G O

P R E S E N T A:

JESÚS PÉREZ JUÁREZ



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
2012**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

| | |
|---|--|
| <p>Datos del alumno</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido materno</p> <p>Nombre</p> <p>Teléfono</p> <p>Universidad Nacional Autónoma de México</p> <p>Carrera.</p> <p>Número de cuenta.</p> | <p>Pérez</p> <p>Juárez</p> <p>Jesús</p> <p>57-52-05-44</p> <p>Biología.</p> <p>09233927-7</p> |
| <p>Datos del tutor</p> <p>Grado</p> <p>Nombre (s)</p> <p>Apellido paterno.</p> <p>Apellido materno.</p> | <p>Dr.</p> <p>Arturo Carlos II</p> <p>Becerra</p> <p>Bracho</p> |
| <p>Datos del sinodal 1.</p> <p>Grado</p> <p>Nombre (s)</p> <p>Apellido paterno.</p> <p>Apellido materno.</p> | <p>Dr</p> <p>Pablo</p> <p>Padilla</p> <p>Longoria</p> |
| <p>Datos del sinodal 2.</p> <p>Grado</p> <p>Nombre (s)</p> <p>Apellido paterno.</p> <p>Apellido materno.</p> | <p>Dr.</p> <p>Alexander</p> <p>De Luna</p> <p>Fors</p> |
| <p>Datos del sinodal 3.</p> <p>Grado</p> <p>Nombre (s)</p> <p>Apellido paterno.</p> <p>Apellido materno.</p> | <p>M en C.</p> <p>Alfonso José</p> <p>Vilchis</p> <p>Peluyera</p> |
| <p>Datos del sinodal 4.</p> <p>Grado</p> <p>Nombre (s)</p> <p>Apellido paterno.</p> <p>Apellido materno.</p> | <p>Dra.</p> <p>América Nixtin</p> <p>Castañeda</p> <p>Sortibrán</p> |

“Encuentro difícil comprender a un científico que no reconoce la presencia de una razón superior, detrás de la existencia del universo, como comprender a un teólogo que se atreve a negar el avance de la ciencia. Ciertamente no existe ninguna razón científica de por qué Dios no puede tener la misma relevancia en nuestro mundo moderno como la que ha tenido antes de que empezáramos a escudriñar su creación con el telescopio, el ciclotrón y los vehículos espaciales”.

WERNHER VON BRAUN.

Físico, matemático y padre de la tecnología aeroespacial.

“En algún rincón perdido del universo hubo una vez una estrella sobre la cual una raza inteligente inventó el conocimiento. Fue el minuto más arrogante y mentiroso de la historia universal”

FRIEDRICH NITZSCHE

Agradecimientos

A mi madre por darme la vida así como la formación moral y espiritual que me han permitido salir adelante, a mi padre por ser un ejemplo de trabajo y responsabilidad.

A mi hermano Horacio que me ha enseñado el valor de la perseverancia.

A mi hermana Olga por su continua superación, independencia y disposición a ayudar.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme un lugar en sus muy demandadas y respetables aulas.

A la facultad de Ciencias por ser mi segundo hogar en los últimos seis años y a sus profesores comprometidos con la formación del futuro de nuestro país.

Al Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho por su asesoría siempre puntual y por la confianza depositada en mi persona para el desarrollo del proyecto y la elaboración del presente trabajo.

A la M.C. Fabiola Ramírez Corona, por el apoyo técnico en el montaje de las técnicas de biotecnología y corrimiento de todos los experimentos de la tesis.

Al Lic. Mario Sánchez Domínguez por su asesoría y ayuda en la elaboración del modelo matemático y por la espléndida colaboración de los últimos meses.

Al Dr. Alexander de Luna Fors, por darme un espacio en su laboratorio en el verano del 2009 lugar donde se gestaron las primeras nociones e ideas sobre el presente trabajo.

Al Dr. Pablo Padilla Longoria y a todos los involucrados en el taller de biología sintética que me permitieron abrir una nueva ventana y enriquecer mi visión sobre la biología y el estudio de la ciencia.

A mis revisores Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán y M.C. José Alfonso Vilchis Peluyera por sus comentarios puntuales y concretos que me ayudaron a completar y enriquecer el presente trabajo

A Miguel Tapia Rodríguez de la unidad de microscopía del instituto de ciencias biomédicas por el apoyo técnico, asesoría y orientación siempre puntual..

A Ignacio de la Mora de la unidad de investigación del hospital de pediatría por su apoyo en infraestructura, y valiosa disposición.

Dra Isabel Saad y Dra. María Edith Ponce Márquez por el apoyo en infraestructura.

A Male Álvarez Lara por tu grande y bella amistad.

A Claudia García Rodríguez por los grandes momentos que compartimos y porque me enseñaste el valor de la lealtad.

A Marysol Valdez Hernández, Viridiana Soto Robles, Natalia, Licha, César R. Martínez González, Juan Carlos Salgado Sotelo, Emanuel David López, Richi, René, Poncho, hemos andado "harto" camino y tenerlos de compañeros de viaje me ha hecho más corta y fascinante la ruta.

INDICE:

| | |
|--|----|
| Resumen. | 6 |
| Biología sintética. | 7 |
| La transferencia horizontal de genes (THG) | 8 |
| • Transformación. | 9 |
| • Conjugación. | 10 |
| • Transducción. | 12 |
| ○ Plásmidos. | 13 |
| ○ Bacteriófagos. | 14 |
| ○ Transposones. | 14 |
| • Revisión del problema. | 15 |
| • Implicaciones evolutivas. | 16 |
| | |
| Justificación. | 18 |
| Hipótesis. | 19 |
| Objetivo general. | 19 |
| Objetivos específicos. | 19 |
| Material y método. | 19 |
| Resultados. | 28 |
| Modelado. | 32 |
| Discusión. | 42 |
| Conclusiones. | 46 |
| Referencias. | 47 |
| Apéndices. | 51 |

Resumen.

El presente trabajo plantea una construcción sintética para detectar eventos de transferencia horizontal de genes (THG) utilizando una secuencia promotora y un gen reportero inducible, el promotor se insertó en un vector de resistencia a cloranfenicol (Cm^r) y el gen reportero en un vector de resistencia a kanamicina (Km^r). como modelo *en vivo* se utilizaron células de *E. coli*, las cuales se transformaron con las construcciones genéticas, posteriormente se simuló un microambiente utilizando diferentes dosis de antibióticos en un medio líquido Luria Bertani (LB) con el objetivo de encontrar una dosis óptima que funcionara como presión de selección, los resultados de microscopía muestran la expresión del gen reportero (proteína verde fluorescente GFP), lo cual apoya la hipótesis de que la THG además de ser un mecanismo que proporciona variabilidad, puede constituir un recurso de sobrevivencia bajo condiciones de estrés en procariontes. Dado que el enfoque utilizado es biología sintética se incorpora la descripción del fenómeno utilizando un modelo matemático para el cual se elaboraron ecuaciones que describen la aparición del evento en una línea de tiempo de 12 horas utilizando como parámetros concentraciones de antibióticos. El modelo matemático constituye una aproximación teórica y asume como hipótesis nula que el evento deberá aparecer en un tiempo estimado de 6 horas, dichas ecuaciones se simularon utilizando una gráfica en la cual el eje X esta dado por concentraciones de cloranfenicol el eje Y de kanamicina, el eje Z constituye el tiempo.

El sistema para detectar eventos de THG que se describe en el presente trabajo es una método teórico – experimental que tiene como objetivo cuantificar la THG y proponer un factor de corrección en reconstrucciones filogenéticas donde la THG se asume como elemento que genera ruido y resta precisión a estudios de ancestría descendencia.

Biología sintética:

La biología de sistemas y la biología sintética han aparecido como dos disciplinas con amplio potencial de investigación, ambas comparten elementos en común sin embargo, en un sentido estricto, la primera se enfoca a entender el funcionamiento de los sistemas vivos desde una premisa que sostiene que los organismos están constituidos de funciones parciales e independientes las cuales se encuentran interconectadas por medio de redes. La biología sintética por su parte se enfoca en aplicaciones prácticas, con un alto componente económico e industrial (Morange, 2009).

El título *biología sintética* aparece en la literatura en 1980 y es utilizado por Barbara Hobom (Hobom, 1980) para describir bacterias las cuales habían sido genéticamente modificadas por medio de tecnología de DNA recombinante, a partir de ese momento no existen más antecedentes en su utilización sino hasta el año 2000, cuando en el congreso anual de la Sociedad Americana de Química en San Francisco, Eric Kool utiliza el término para describir la síntesis de moléculas orgánicas inducidas utilizando un modelo en vivo (Rawls, 2000).

A pesar de que cada día se encuentra mayor cantidad de literatura y referencias, el término no es ajeno a críticas y suspicacias, por lo que autores más conservadores prefieren utilizar términos tales como *partes naturales en sistemas biológicos*, para referirse a fragmentos de DNA y proteínas comúnmente denominados como “biobricks” (Benner, 2011).

La biología sintética con base en partes estandarizadas tiene como objetivo diseñar módulos de información genética que desarrollen tareas en las células que originalmente no se llevan a cabo, utilizando una analogía respecto a la ingeniería computacional. La implementación de estos módulos sería equivalente al funcionamiento de transistores, capacitores, resistencias etc. Estos dispositivos funcionarían tal como lo hacen reacciones bioquímicas que regulan el flujo de información sintetizando lípidos, carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos etc. (Andrianantoandro y Basu, 2006)

La biología sintética con base en partes estandarizadas utiliza una colección de dispositivos biológicos que al ser ensamblados funcionan como circuitos integrados o módulos; la conexión de estos módulos con la maquinaria celular permite extender o modificar sus funciones originales, la falta de predictibilidad y conocimiento respecto a mecanismos de regulación e interacciones a

nivel molecular, mutaciones, ruido en la expresión genética etc, a menudo hacen que los sistemas sean incompletos y difíciles de implementar en soluciones prácticas. (Andrianantoandro y Basu, 2006).

Como en cualquier disciplina emergente, la terminología puede ser confusa, ya que se adoptan palabras o frases de otras áreas para describir funciones y procesos, *máxime* si estas funciones se utilizan en un campo totalmente ajeno como lo es la ingeniería electrónica o computacional; un ejemplo son términos como “switch”: un “switch” genético es utilizado como un intermediario para conectar la respuesta con un estímulo, este estímulo puede ser temperatura, sonido, concentraciones de una sustancia química, densidad, etc. Otro ejemplo es un chasis, el cual en el contexto de biología sintética es un término que se utiliza para definir un organismo modelo (Canton y Labno, 2008).

No obstante, su aplicación orientada en un 95% a problemas de carácter económico e industrial, la amplia flexibilidad del enfoque nos permite abordar preguntas de carácter básico como se verá a continuación.

La transferencia horizontal de genes (THG).

El auge y la disponibilidad de recursos técnicos ha tenido un gran impacto en el estudio de los fenómenos relacionados con la información genética, en particular el análisis comparativo de genomas ha permitido obtener cada vez más y mejores aproximaciones sobre la importancia de la THG en procesos evolutivos introduciendo información genética novedosa (Ravi y Jain, 2003). En la literatura se pueden encontrar a algunos autores que describen a la THG como “la esencia de procesos filogenéticos” (Doolittle y Orgel, 1999) o como el “big bang” biológico (Koonin, 2007), algunos otros consideran estas afirmaciones como una exageración (Kurland y Canback, 2003), y más bien lo atribuyen a métodos poco adecuados para el estudio de la THG.

La transferencia horizontal de genes se define como una serie de mecanismos por medio de los cuales fragmentos de material genético se transmiten de una célula donadora a una célula receptora sin necesidad de reproducción asociada a herencia vertical, estos mecanismos se definen como transformación, transducción y conjugación (Dirk y Turner, 2003). Aunado a dichos

mecanismos existen vehículos o agentes específicos que permiten llevar a cabo la THG, estos son plásmidos, bacteriófagos y transposones (Frost y Leplae, 2005), la figura 1 muestra de una forma esquemática y sobre simplificada los tres mecanismos conocidos de transferencia de información genética también conocidos como procesos de parasexualidad.

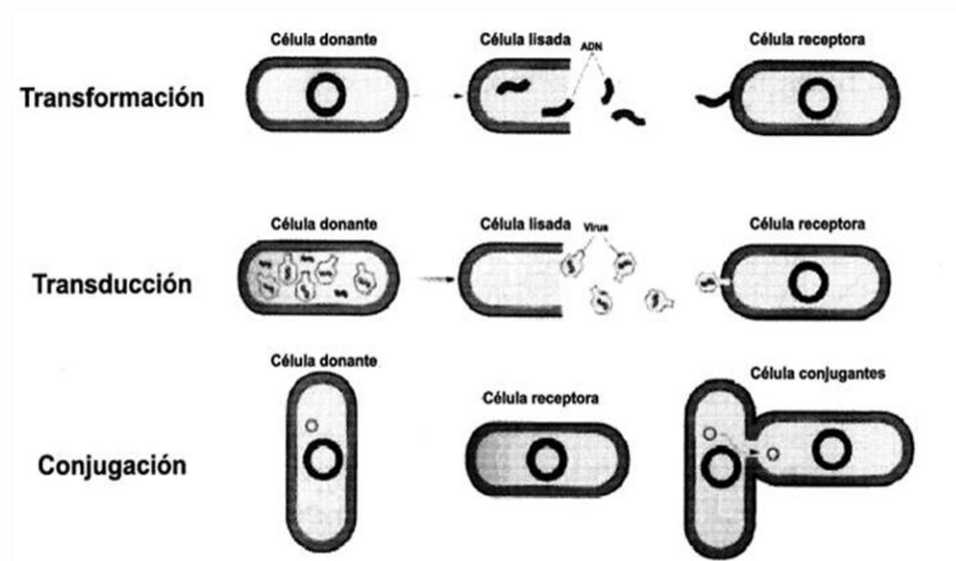


Fig. 1 Mecanismos de transferencia horizontal de genes.

Transformación:

La transformación fue el primer mecanismo en ser relacionado directamente con la THG, su estudio se remonta al año 1928; este año Frederick Griffith, bacteriólogo inglés estudiaba la posibilidad de desarrollar una vacuna contra *Streptococcus pneumoniae*, (bacteria causante de neumonía) utilizando un modelo en ratón; en ese momento ya se sabía que existía una forma virulenta (que causaba la enfermedad) y una no virulenta que era inocua (no causaba la enfermedad), la forma virulenta estaba cubierta por una cápsula de polisacáridos y la no virulenta carecía de cápsula (Griffith, 1928).

Griffith estaba interesado en observar si al inocular la bacteria muerta por calor podía inducir inmunidad contra la enfermedad, realizó un experimento donde inoculó de forma simultánea ratones con bacterias virulentas muertas por calor y bacterias no virulentas vivas, las cuales por separado eran inocuas (no causaban la enfermedad), sin embargo al inocularlas juntas todos los

ratones murieron. En este momento la pregunta era ¿cuál había sido el factor que les habría proporcionado la virulencia? ¿Habían revivido las bacterias virulentas muertas o algo había sido transferido desde ellas a las células vivas no virulentas que les daba la capacidad de transformarse en virulentas? (Lewin, 2008).

En años posteriores se demostró que el mismo fenómeno podía reproducirse en un tubo de ensayo. Se encontró que cuando los extractos de las bacterias encapsuladas muertas se agregaban a los cultivos de bacterias inocuas, podían convertir estas últimas en virulentas, además una vez transformadas podían transmitir este fenotipo a la progenie. Este fenómeno recibió el nombre de **transformación** y a lo que causaba la conversión se denominó *factor transformador* (Avery y McCarty, 1944).

En bacterias la transformación es un mecanismo común que consta de cinco pasos:

1. Liberación o aparición de DNA en el medio que rodea a la célula.
2. Inducción de un estado competente en la célula receptora (hospedero).
3. Interacción de la célula y el DNA que se encuentra en el medio.
4. Asimilación y procesamiento del DNA.
5. Integración, amelioracion y expresión (Mazodier y Davies, 1991).

La capacidad para incorporar DNA a partir del medio externo ha sido reportada en el phylum *archaea* ej. *Thermus* spp, *Deinococcus* spp. y en bacterias incluyendo gram – positivas (Paget y Simonet, 1994). También existen ejemplos en bacterias patógenas ej. *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas* etc (Lorenz y. Wackernagel, 1994). Esta capacidad ampliamente conservada de adquirir DNA del medio que rodea a las bacterias es evidencia de que se trata de una estrategia importante de sobrevivencia y adaptación a nuevos nichos ecológicos.

Conjugación:

Se conoce como conjugación al mecanismo por medio del cual una estructura denominada pili, se acopla a la membrana de una célula receptora, el pili es un filamento proteico presente en *Escherichia coli* y otras células gram-negativas, se trata de una estructura cilíndrica que incorpora material genético a través de un poro. Técnicamente a la célula donadora se de denomina F^+ y la

célula receptora F^- (Hayes, 2000), la célula F^+ sólo transfiere una copia de su DNA lo cual implica que presenta una o dos copias por célula (Lederberg y Tatum, 1953).

Dada la importancia del pili como estructura de transporte es importante mencionar detalles sobre su funcionamiento. Estudios de cristalografía y microscopía han revelado que se trata de un filamento extremadamente delgado ($\sim 60-80 \text{ \AA}$) con una longitud ($>1 \mu\text{m}$), su funcionamiento se ha detallado a través de una secuencia de 5 pasos *i)* Una subunidad denominada “n” se adhiere al filamento por difusión y atracción electrostática *ii)* El pili ensambla ATPasa en el citosol e hidroliza ATP *iii)* La hidrólisis de ATP induce un pistón asociado a la membrana *iv)* El pili sale de la membrana *v)* El ATP es remplazado por una molécula de ADP, la membrana se relaja y recupera su posición original (Craig et al. 2006).

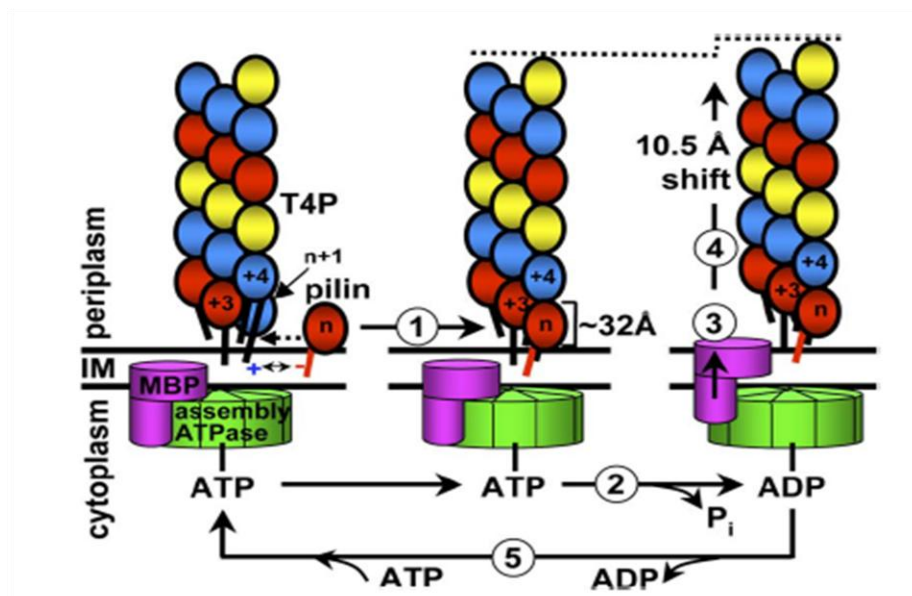


Fig 2. Actividad del pili en su interacción con la membrana celular.

La THG comienza en un sitio específico del donador F^+ denominado oriT (origen de transferencia), en este punto participa una enzima que rompe el oriT denominada relaxasa, que junto con proteínas auxiliares forma una estructura denominada complejo del relaxosoma, este complejo empuja al plásmido que es transferido a la célula receptora F^- (Byrd y Matson, 1997); posterior a la transferencia ambas células se separan. La F^- es ahora F^+ y en términos de fenotipo puede actuar como célula donadora en eventos subsecuentes.

Diversos mecanismos inciden en la tasa de conjugación, se han reportado casos en donde dicha tasa puede estar regulada por *quórum sensing* (sistema de comunicación intracelular que le permite a las bacterias monitorear condiciones ambientales antes de expresar un fenotipo) (Whitehead y Barnard, 2001); otro factor que incide es la presencia de compuestos antimicrobiales ej. concentraciones de tetraciclina la cual se ha reportado como un agente con capacidad de inducción (Showsh y Andrews Jr, 1992), así como temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, cationes, densidad poblacional etc. (Khalil y Gealt, 1987).

Transducción:

La transducción es el mecanismo en el cual participan bacteriófagos como vehículos en la THG, el ciclo lítico se compone de un vector (el virus) el cual se acopla a la membrana del hospedero, el virus inyecta material genético, la replicación comienza casi de forma instantánea en un tiempo estimado de quince a veinte minutos a partir de la infección, el fago utiliza la estructura celular para replicar partículas virales las cuales quedan listas para infectar a otras células (Faruque y Nair, 2002).

Desde su descubrimiento los en 1917 los bacteriófagos captaron la atención como un tema relevante de investigación; por características tales como estructura y tamaño algunos investigadores los consideraron como la forma más primitiva de vida y probablemente como “genes desnudos”; es en ese mismo año Felix d’Hérelle reportó un microbio que era antagonista de la bacteria y como resultado de la lisis que previamente había preparado en un cultivo líquido y esparcido en una placa de agar con cultivo mataba a las bacterias en zonas discretas que denominó “placas” d’Hérelle concibió estos microbios invisibles como “ultravirus” que invadían a las bacterias y se multiplicaban a los cuales denominó como bacteriófagos (Calendar, 2006).

Diversos estudios realizados con el fago λ por André Lwoff y colaboradores ayudaron a entender el mecanismo de regulación del ciclo lítico y lisogénico; el represor λ se une a los promotores en la fase temprana del ciclo lítico de esta forma bloquea su actividad; para que el ciclo lítico se complete requiere de proteínas que necesariamente se sintetizan en las primeras etapas de la replicación, estas participan en la formación de la cápside y la cola por lo tanto la actividad del represor inhibe la síntesis de proteínas esenciales para la formación estructural de nuevas partículas virales (Bushman, 2002).

Un aspecto importante que determina si el ciclo se transforma en lítico o lisogénico es la abundancia o ausencia de CII, la cual es una proteína que funciona como activador transcripcional, la ausencia de CII promueve un ciclo lítico mientras que su abundancia activa genes que promueven un ciclo lisogénico, la concentración de esta proteína dentro de la célula a su vez se encuentra determinada por proteasas que funcionan como antagonistas (Kihara y Akiyama, 1997).

La forma en cómo se fijan segmentos de información genética durante la transducción ha sido amplio objeto de estudio, aparentemente el hospedero favorece la fijación de segmentos de DNA en regiones con cierta homología. Roger Hendrix y colaboradores (Hendrix, 1999) compararon fagos que utilizan como hospederos familias de bacterias evolutivamente distantes, *Mycobacteria* (Φ Rv1, Φ Rv2, L5 y D29), *Streptomyces* (Φ C31), y *Haemophilus* (Φ flu). Los resultados mostraron que muchos fragmentos de DNA tienen una gran similitud a pesar de que la distancia evolutiva abarca desde bacterias gram negativas (*E. coli*, *Salmonella*, *Haemophilus*) hasta gram positivas (*Streptomyces*); esta similitud aparentemente se atribuye a eventos de THG.

Aunado a la THG existen vehículos que juegan un papel central en el fenómeno, el estudio de estos agentes es de suma importancia para comprender el fenómeno de una forma integral.

Plásmidos.

Los plásmidos tienen una gran importancia como vehículos en la THG; el término fue utilizado por primera vez en 1952 por Joshua Lederberg (Lederberg, 1998) como un término genérico para referirse a DNA extracromosomal, actualmente se define como una colección estable de información genética organizada en módulos; los plásmidos generalmente no contienen información genética implicada en funciones celulares esenciales, por lo común presentan una estructura circular de doble cadena de DNA, sin embargo han sido reportados casos con las mismas características pero con un arreglo lineal (Frost y Leplae, 2005).

La longitud de los plásmidos puede variar de una a más de cuatrocientas kilobases (kb) pueden aparecer como una copia simple o en cientos de copias dentro de una misma célula, comúnmente incluyen un conjunto de genes que les permiten realizar funciones de auto replicación, el material genético se acumula sin interferir con las funciones de la célula hospedera, se pueden clasificar de acuerdo a cinco funciones básicas: fertilidad (F), resistencia (R), "Col-plasmids" (éstos contienen

genes que codifican para colicinas y proteínas capaces de matar a otras bacterias), así como metabolitos con capacidad de degradar sustancias químicas y transformar bacterias convirtiéndolas en patógenas (Thomas y Nielsen, 2005).

Bacteriófagos.

Normalmente conocidos como “fagos”, son virus que infectan bacterias, (se encuentran constituidos por una estructura sencilla), diferentes análisis de microscopía revelan proteínas en forma de bloques que conforman la cápside y la cola así como material genético que le permite realizar funciones de replicación, recombinación y regulación. El material genético puede tener una longitud de 5 a 500 kilobases (kb) adoptando una estructura circular o lineal, el arreglo puede ser muy variable, presentándose como cadena sencilla o doble de RNA, de igual forma para el DNA. Esto ha permitido una distribución cosmopolita, a pesar de su tamaño (entre 20 y 200 nm) son extremadamente activos en términos ecológicos y en su papel como depredadores contribuyen a mantener un control efectivo en poblaciones bacterianas (Kunin y He, 2008).

Transposones.

Los transposones son unidades genéticas con una gran diversidad tanto en su estructura como en mecanismo; su movimiento y acumulación ha constituido una de las fuerzas más importantes en la formación de genes y genomas tanto en células eucariontes como procariontes. Se pueden clasificar en tres grupos, *i)* con capacidad de escindirse del DNA e insertarse en cualquier lugar del genoma *ii)* los que utilizan un mecanismo relacionado con el ciclo de replicación *Helitrones* *iii)* *Mavericks* cuyo mecanismo de transposición aún no se encuentra bien estudiado pero que probablemente utiliza para su replicación un tipo de polimerasa propia (Cédéric y Feschote, 2007).

Los transposones se caracterizan por presentar un gen que codifica la enzima denominada *transposasa* la cual cataliza su inserción en un nuevo sitio al azar. Cada extremo contiene una secuencia repetida de nucleótidos, esta secuencia puede consistir en una repetición como ATTCAG o repeticiones invertidas como GACTTA. Las secuencias repetidas generalmente contienen de veinte a cuarenta nucleótidos, en algunos casos el transposón se escinde del cromosoma y se inserta en lugar distinto (Heffron y McCarthy, 1979).

Existen casos en donde los transposones en realidad no se mueven es decir no desaparecen de su sitio original, cuando aparecen en una nueva ubicación se debe a que el transposón original produce una copia que es la que se inserta en un nuevo sitio (Morgante et al, 2005).

Revisión del problema:

La adaptación de bacterias a nuevos nichos ecológicos frecuentemente se asocia a la capacidad de adquirir información genética por medio de THG, sin embargo no es claro cómo y con qué frecuencia información nueva puede incorporarse al genoma del hospedero; algunos estudios revelan la forma en como genes que participan en funciones esenciales por ejemplo, regulación de interacciones proteína – proteína raramente son favorecidos por selección natural, y en caso de que esta se dé, se manejan estimaciones entre ocho y veintidós millones de años para que puedan superar barreras tales como estabilización, flujo de información y cambios en el uso de codón (Lercher y Pál, 2008).

La THG es un fenómeno que debe ser analizado como una sucesión de pasos; *i*) La información debe pasar físicamente a una célula receptora incorporándose al genoma, *ii*) La propagación en una población (fijación); durante este paso la información genética estará sujeta a presiones de selección, y a una integración funcional preliminar, *iii*) Debe pasar por un periodo de “puesta a punto” (amelioración) en donde interactúa con mecanismos bioquímicos generados por presiones externas e internas que le permitan ser optimizada (Lercher y Pál, 2008).

En el contexto de la problemática sobre el fenómeno de la THG, es necesario hacer referencia al uso de codón (UC); el UC representa una zona de seguridad o tolerancia donde la información genética exógena puede ser traducida de forma eficiente, dicha zona refleja la compatibilidad con la maquinaria de traducción del organismo hospedero, un UC típico o rico maximiza la eficiencia en los niveles de expresión; la compatibilidad en el uso de codón y la maquinaria de traducción puede ser un prerrequisito para que la selección natural pueda evaluar las ventajas selectivas de funciones importadas por la célula. De ser así un uso de codón atípico funcionaría como una barrera importante contra la adquisición y posterior utilización de información genética exógena (Soto, 2005).

La noción anterior se apoya en un estudio realizado por (Medrano, Moreno, Vinuesa, Christen, 2004) en el cual se hicieron análisis comparativos utilizando secuencias de genes *xenólogos*

(relación que surge cuando se intercambia material genético entre especies); en dicho estudio se encontró evidencia sobre como una utilización típica de UC constituye un rango óptimo donde genes exógenos pueden ser expresados adecuadamente, por el contrario un UC pobre representa una barrera importante en la expresión y utilización de genes foráneos.

Otro elemento a considerar dentro de la problemática de estudio es la posibilidad de qué genes sean transferidos, la hipótesis de complejidad postula que es poco probable que genes informacionales (aquellos involucrados en la transcripción, traducción y procesos relacionados) se transfieran en comparación a genes operacionales (aquellos involucrados en el mantenimiento de la célula) debido a que por su naturaleza necesitan establecer mayor cantidad de interacciones físicas con otros genes (Jain y Rivera, 1999).

Adicional a los elementos citados anteriormente es pertinente mencionar que debido al potencial riesgo que representa para las células incorporar material genético, éstas han desarrollado mecanismos de protección que les permiten detectar y silenciar DNA exógeno, en 2007 Charles Dorman (Dorman, 2007) reportó un sistema que denominaron *Heat stable nucleoid-system* (H-NS) en *Salmonella entérica*, el sistema consiste en una proteína con alta afinidad por regiones ricas en AT las cuales son comunes en promotores de bacterias así como en islas de patogenicidad, el H-NS es una proteína relativamente abundante en *E.Coli* y *Salmonella*, aproximadamente 20,000 copias por genoma, la cual se encuentra conformada por un dominio de oligomerización amino terminal y un dominio carboxilo ambos son módulos funcionales conectados por un enlace flexible H-NS se une como un dímero a regiones con una curvatura plana en el DNA en estas regiones la proteína lleva a cabo funciones de polimerización. H-NS es una proteína expresada en cantidades relativamente constantes en *Escherichia coli* y *Salmonella* y los genes que controlan su expresión se encuentran regulados por distintos factores estos incluyen un mecanismo de auto represión así como la interacción con un paralogo denominado StpA. Fis es un activador transcripcional de H-NS y se ha reportado que también interviene CspA el cual es un activador a temperaturas de menos quince grados (*cold shock*).

Implicaciones evolutivas:

La evolución de los organismos es un fenómeno que involucra al menos tres procesos; variabilidad, herencia y selección natural, en el caso de organismos procariontes estos comparten características que denotan un ancestro común, de la misma forma cada especie posee

características particulares que les permiten habitar y cohabitar en diferentes nichos ecológicos, aunque no podemos referirnos a un sólo mecanismo como responsable de esta plasticidad es necesario tener en cuenta como diferentes fuerzas han interactuado y permitido una amplia diversificación y eficiente adaptación (Ochman y Lawrence, 2000).

El intercambio de material genético entre organismos divergentes ha permitido acelerar procesos evolutivos; por medio de THG se han podido transferir u optimizar funciones tales como vías metabólicas, que en otras circunstancias habrían tomado millones de años, no es raro que con las técnicas disponibles en la actualidad se puedan localizar genes idénticos que codifican enzimas involucradas en procesos de organismos filogenéticamente distantes (Ravi y Jain, 2003).

Las reconstrucciones filogenéticas han mostrado aspectos importantes de la THG y su papel en la evolución, un caso que ha permitido un estudio amplio sobre el tema es el de *Escherichia coli* y su hermana patógena *Salmonella enterica*. Esta última presenta una cantidad importante de genes que no se encuentran en *E. coli*, Los análisis han revelado regiones vestigiales adyacentes a genes funcionales que muy probablemente han estado implicadas en su integración funcional tales como elementos de translocación, regiones con amplia similitud a orígenes de transferencia presentes en plásmidos (oriT) así como integrasas de fagos (Lan y Reeves, 2006).

No es común que se mencione la recombinación homóloga como una fuerza asociada a la THG sin embargo puede jugar un papel importante sobre todo en organismos cercanos filogenéticamente, este mecanismo facilita la variabilidad así como la integración, una estimación establece que aproximadamente entre el 10 y 16% del genoma total de *E. coli* podría estar constituido por eventos de THG (Ochman y Lawrence, 2000).

Justificación:

Se han diseñado diferentes métodos bioinformáticos para identificar eventos de THG, estos se pueden clasificar en dos grupos a) métodos composicionales y b) de anomalías en la distribución filogenética. Éstos a su vez se pueden subdividir en diferentes categorías, sin embargo todos son imperfectos por lo que pueden arrojar falsos positivos o falsos negativos, aunado a lo anterior no existen metodologías que incorporen un control experimental que valide o descarte resultados obtenidos *in silico* (Gogarten y Fournier, 2007) (Boekels y Gogarten, 2009).

La THG no se limita sólo a problemas de carácter evolutivo, el descubrimiento de antibióticos y su introducción a finales de la década de los cuarenta es considerado como uno de los grandes avances en medicina del siglo XX (Davies, 2010); sin embargo éste se ha visto mermado por la pertinaz aparición de resistencia a los mismos lo cual les resta efectividad y constituye en nuestros días un problema de salud pública (Davies, 2007). Los primeros reportes sobre el fenómeno se centraron en el estudio de mutaciones puntuales, las cuales deshabilitan el mecanismo de acción, sin embargo a mediados de la década de los cincuentas se reporta la adquisición de resistencia por medio de un plásmido (Kitamoto, 1956). Desde entonces varias preguntas han surgido primera: ¿Cómo es posible detectar eventos de THG? Segunda: ¿cuál es el origen de estos fragmentos de información genética? Tercera: ¿qué tipos y cuáles son sus características de movilización? Por lo anterior es importante desarrollar metodologías que permitan estudiar el fenómeno desde el enfoque evolutivo, incorporando elementos experimentales y sobre todo de cuantificación.

Lo anterior constituye sólo un par de ejemplos sobre la importancia del estudio de la THG, sin embargo la dinámica actual en el avance de técnicas sobre análisis filogenético, poder de cómputo, y técnicas de laboratorio permiten conocer cada día más detalles sobre las implicaciones de este tipo de fenómenos a nivel de genoma y sus consecuencias como un problema de salud pública, en estas circunstancias aún estamos lejos de conocer los riesgos y consecuencias.

Hipótesis:

La THG puede ser detectada utilizando una construcción genética y una presión de selección.

Objetivo general:

- Diseñar y probar una metodología experimental para detectar eventos de THG *in vivo* en *E.coli*.

Con el fin de probar las construcciones (promotor y reportero) se diseñó un microambiente que consistió en un medio líquido nutritivo Luria Bertani (LB) utilizando concentraciones de antibióticos diferenciadas en un gradiente, lo anterior es importante ya que la metodología propuesta se encuentra orientada en primer lugar al diseño y prueba de un sistema experimental en segundo término a la cuantificación *in vivo* de la THG, para lo cual es necesario definir las condiciones óptimas en las cuales el fenómeno puede ocurrir.

Siguiendo la lógica de ser un trabajo de biología sintética, se plantea una ecuación estocástica que incorpora como parámetros iniciales las concentraciones bajo las cuales el experimento fue desarrollado así como un componente probabilístico, lo anterior constituye una aproximación a la cuantificación y ocurrencia de la THG utilizando parámetros experimentales, no se descarta que existan metodologías más robustas y sofisticadas desde las cuales se puedan obtener mejores parámetros así como un sistema de ecuaciones diferenciales que permitan cuantificar con precisión las condiciones en que el fenómeno puede ocurrir.

Objetivos específicos:

- A partir de una colección de biopartes disponible en <http://partsregistry.org/Catalog> identificar un promotor y un reportero complementarios que emitan una señal visible de la proteína verde fluorescente (GFP).
- Insertar ambas secuencias en dos vectores con resistencia a cloranfenicol y kanamicina (Cm^r y Kan^r) por separado.
- Transformar células competentes de *Escherichia Coli* cepa DH5α F⁺ con los vectores.
- Generar un gradiente de diferentes concentraciones de antibiótico que funcione como presión de selección.

- Simular un microambiente utilizando un medio líquido nutritivo y exponer a las células transformantes.
- Identificar eventos de THG a través de microscopía de fluorescencia.
- Modelar el fenómeno utilizando un modelo estocástico.
- Simular el tiempo en que puede ocurrir la THG utilizando un modelo de ecuaciones.

Material y método:

Se realizó una búsqueda en la base de datos <http://partsregistry.org/Catalog> en donde fueron seleccionadas las siguientes biopartes: K145201 como promotor, J01101 y I763011 como reportero (Fig 3):

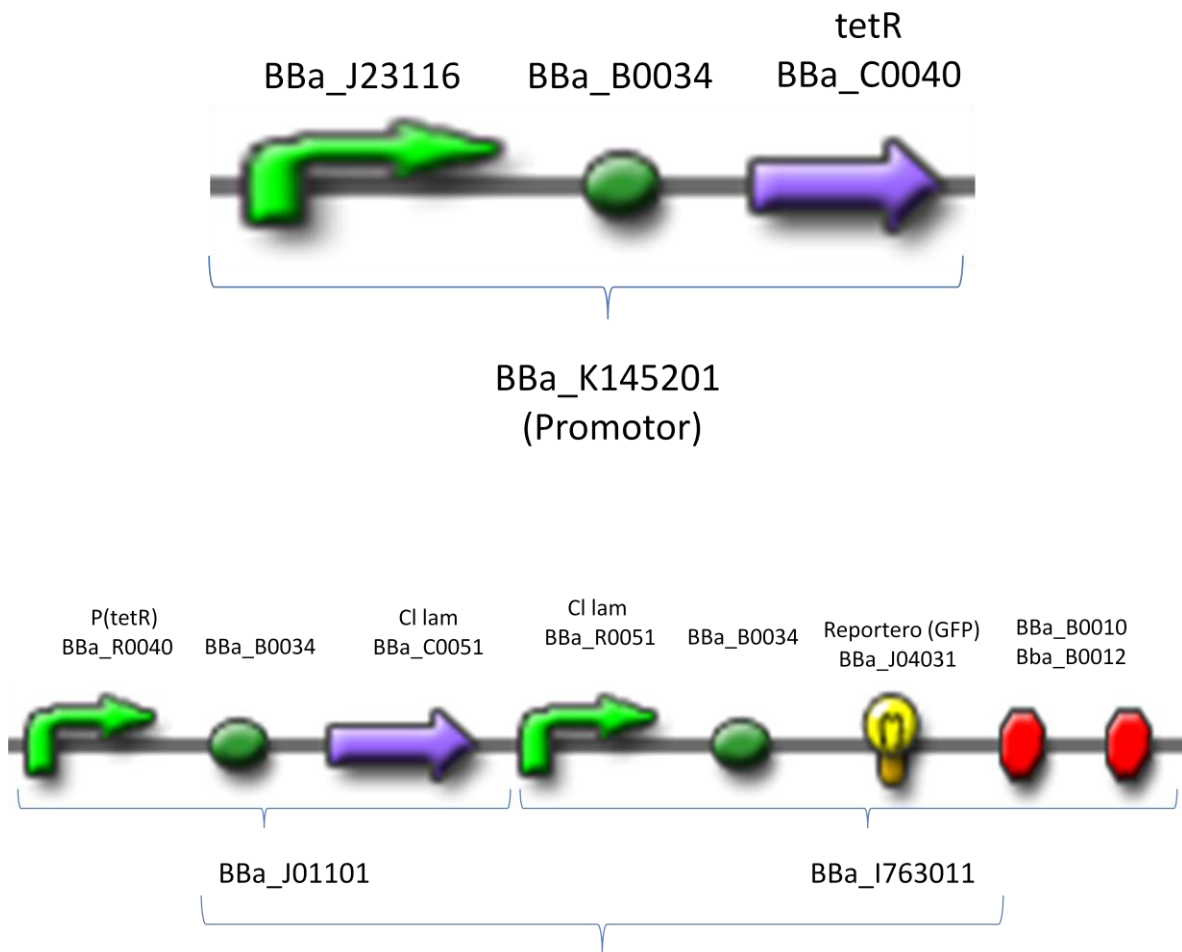


Fig 3. Dos Construcciones genéticas que contienen un promotor y un reportero inducible (GFP).

La distribución de biopartes o biobricks consiste en una colección de aproximadamente 1800 genes o secuencias de DNA que han sido caracterizadas es decir han seguido un control de calidad para asegurar que sean fragmentos de información genética funcional, estas biopartes están constituidas por promotores, sitios de unión al ribosoma, dominios de proteínas, terminadores etc. Las biopartes se presenta como DNA liofilizado en una placa que se distribuye cada año a los equipos que participan en el IGEM el cual es un certamen donde grupos de universidades de todo el mundo presentan proyectos propios de biología sintética etc.

De la distribución para el año 2009 <http://partsregistry.org/assembly/libraries.cgi?id=15>, http://partsregistry.org/Repository:iGEM_2007_DNA_distribution/AB_Test/Source_Plate_1 se ubicaron las siguientes coordenadas: Para BBa_K145201 placa 2 4H, para BBa_J01101 placa 1 11H, para I763011 placa 1 15L.

Se prepararon células competentes cepa DH5 α (apéndice 1), cuya efectividad fue probada tomando una alícuota al azar y siendo transformada con un gen reportero RFP (*red fluorescence protein*) http://partsregistry.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_J04450.

Para cada una de las biopartes incluyendo el vector de kanamicina se perforó el pozo con la punta de una pipeta, se hizo una elusión con 15 μ l de ddH₂O precalentado 10 min a 65°C, para la transformación se tomaron 3 μ l de DNA plasmídico y se homogenizó por separado con células competentes en tubos eppendorf de 1.5ml. Cada tubo se sometió a choque térmico en baño maría a 42°C por 50 segundos, inmediatamente fueron transferidos a hielo dos minutos, se adicionaron 300 μ l de medio LB la mezcla se incubó a 37°C en agitación constante 90 minutos. De la transformación se sembraron 100 μ l en cajas petri, dos preparadas con kanamicina y seis con ampicilina, las cuales fueron selladas con cinta parafilm, las cajas se incubaron 12 horas (*overnight*) (apéndice 2).

El vector de resistencia a cloranfenicol (PSB1C3) se preparó por medio de una triple digestión como se describe a continuación: Con enzimas EcorRI, y Dnpl, se incubó una alícuota de 15 μ l por tres horas a 37°C (apéndice 4), la reacción se detuvo con temperatura a 80°C veinte minutos, posteriormente se realizó una digestión con PstI incubando durante 12 horas (*overnight*), se verificó que no existiera efecto estrella en la hoja técnica del proveedor, (la cual consiste en una

anomalía en la actividad catalítica de la enzima que se manifiesta cortando en sitios no específicos como resultado de sobreexponer la reacción por un tiempo por arriba de la especificación técnica del proveedor). En seguida se transformó utilizando la metodología que se describe en el párrafo anterior.

Una vez que se obtuvieron células transformantes con una punta estéril de 20 µl se picaron colonias y se dejó un cultivo de 12 horas por cada bioparte en 20 ml de medio LB utilizando tubos falcon de 50 ml.

Del inóculo anterior se realizó extracción de plásmido utilizando el protocolo de *midiprep* (apéndice 3); se utilizaron 4 tubos falcon con capacidad de 15 ml los cuales se llenaron con 13 ml de cultivo celular, se centrifugaron a 4,000 rpm dos minutos decantando el sobrenadante, este paso se repitió tres veces por cada tubo hasta obtener una pastilla. Se adicionaron 3 ml de solución Birboim I la pastilla se resuspendió en vortex y se dejó reposar diez minutos a temperatura ambiente, a continuación se adicionaron 3 ml de solución Birboim II y se mezcló por inversión seis veces, cada tubo se dejó reposar 10 minutos en hielo, posteriormente se adicionaron 3 ml de solución Birboim III se homogenizó cuidadosamente por inversión, la mezcla se dejó 10 minutos en hielo, se centrifugó a 4,000 rpm veinte minutos con una pipeta de 100µl se retiró el sobrenadante que fue colocado en tubos *falcon* de 15 ml estériles.

La precipitación del plásmido se realizó con un volumen 1:1 de isopropanol el cual se incubó una hora a -20°C, a continuación se centrifugó a 4,000 rpm 30 minutos, se decantó el sobrenadante dejando aproximadamente 500 µl de isopropanol en el fondo del tubo, la pastilla fue transferida a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml.

Para lavar la pastilla se agregaron 500 µl de etanol al 70%, el tubo se centrifugó a 15,000 rpm diez minutos, se retiró el sobrenadante y se secó al vacío 15 minutos a 45°C, se agregaron 200 µl de agua inyectable y se dejó reposar en *termoblock* 30 minutos a 40°C, la pastilla se re suspendió con una pipeta de 200 µl, a continuación se agregaron 2 µl de RNAsa y se incubó 30 minutos a 37 °C.

Las digestiones y ligaciones se hicieron de acuerdo al estándar 10 http://partsregistry.org/Assembly_standard_10 en este método las biopartes o *biobriks* se encuentran flanqueados por dos sitios de restricción en el prefijo EcoRI y XbaI y dos en el sufijo

SpeI y PstI; la compatibilidad de los extremos permite generar sitios comúnmente conocidos como *pegajosos* (Fig 4).

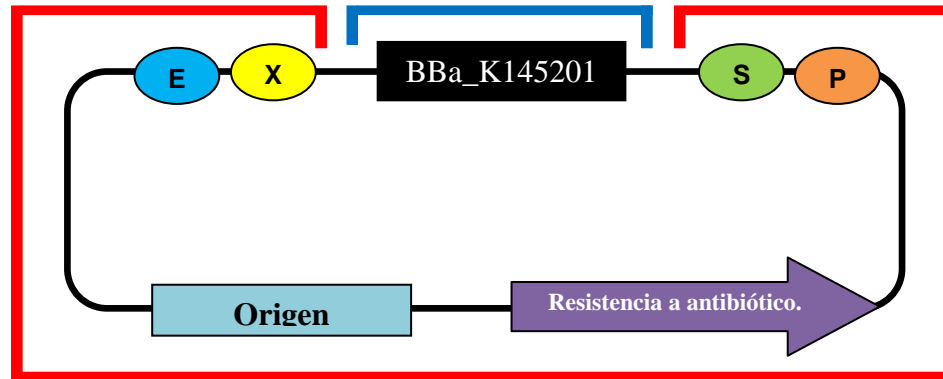
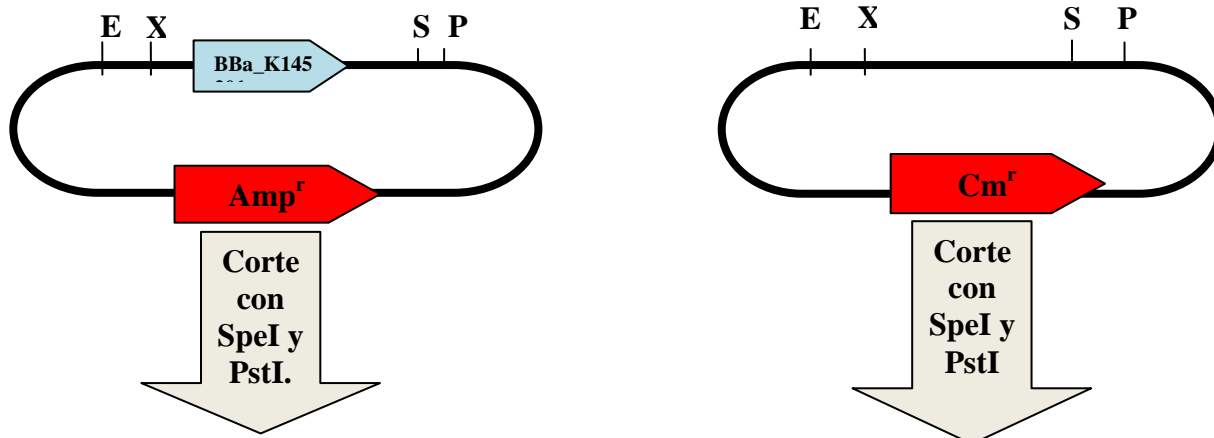
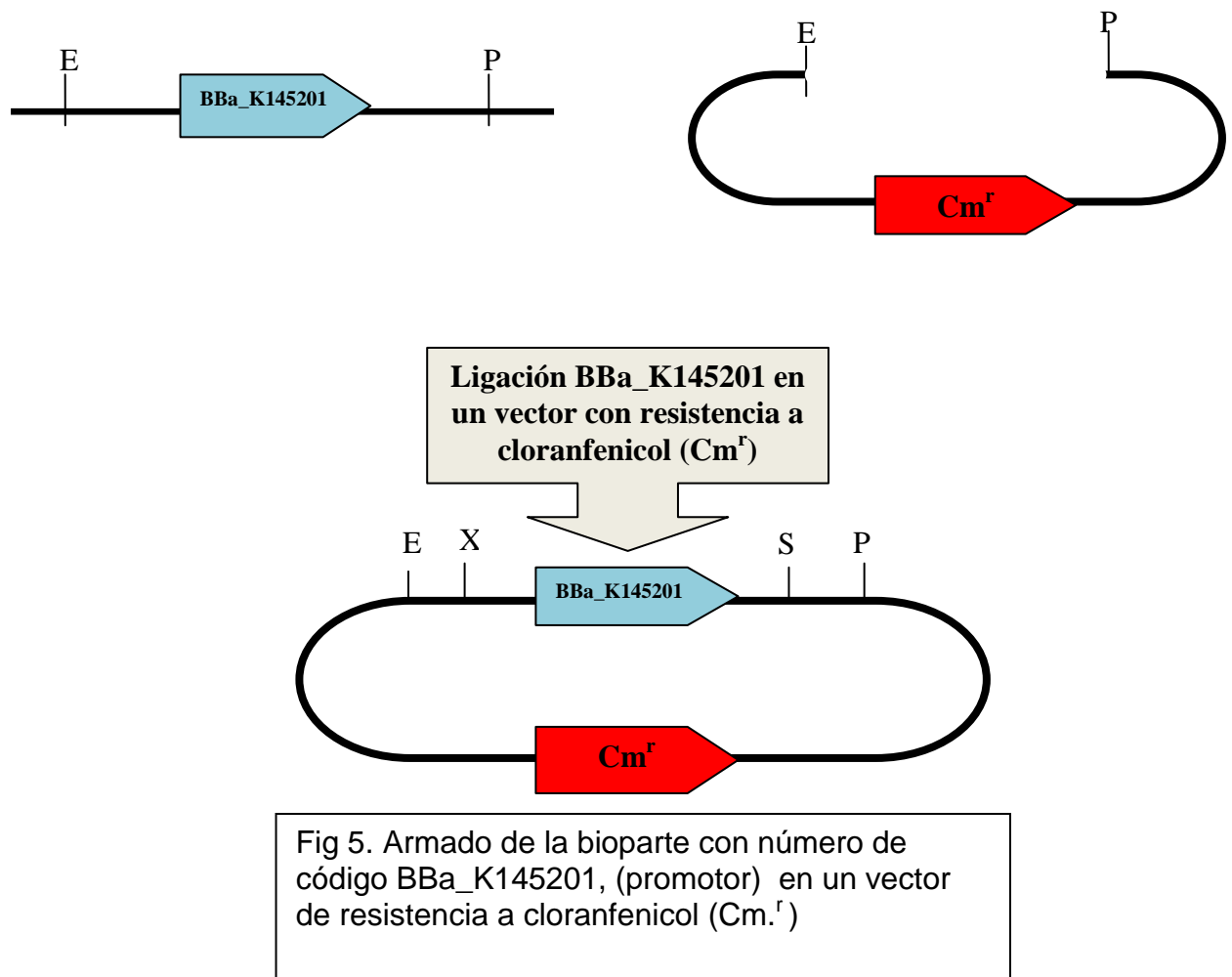


Fig 4. Plásmido que muestra una bioparte con inserto y vector (backbone) modificado de http://partsregistry.org/Plasmid_backbones/Assembly

Para el armado del promotor fueron utilizadas enzimas de la marca Fermentas; se utilizaron 95µl de DNA plasmídico de la bioparte BBa_K145201 la cual fue cortada con EcoRI y PstI (apéndice 4), las digestiones se hicieron por separado; para EcoRI se hizo una digestión de tres horas a 37°C, la actividad catalítica se detuvo incubando en termoblock veinte minutos a 65°C, para PstI se dejó una reacción *overnight* de doce horas, la digestión se comprobó en una electroforesis con gel de agarosa al 1% una hora a 80 volts, a continuación se ubicaron las bandas y con un bisturí se extrajo el fragmento de interés (883± pb). El fragmento fue purificado (apéndice 6) utilizando el kit Gene Jet de Fermentas posteriormente se ligó al vector de resistencia a cloranfenicol utilizando T4 DNA Ligasa.





Para el armado del gen reportero se utilizaron 95µl de DNA plasmídico tanto de BBA_J01101 como de BBA_I763011; ambos plásmidos recibieron el mismo tratamiento en primera instancia utilizando la enzima EcoRI, la digestión se incubó tres horas a 37°C – 175rpm, se detuvo por inactivación térmica en *termoblock* a 65°C veinte minutos. BBA_J01101 se cortó con SpeI y BBA_I763011 con XbaI incubando ambas reacciones tres horas a 37°C en agitación constante a 175rpm, la digestión con SpeI se detuvo adicionando 2mM EDTA pH8.0, XbaI se inactivo en *termoblock* a 65°C veinte minutos.

Para la purificación del plásmido se preparó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con 130µl de DNA digerido de cada plásmido el cual se corrió una hora a 80 volts, a continuación con un bisturí limpio se cortaron las bandas de interés para BBA_J01101 (992 ± pb), BBA_I763011 (971 ± pb) la purificación del plásmido se realizó con el kit Gene Jet de fermentas.

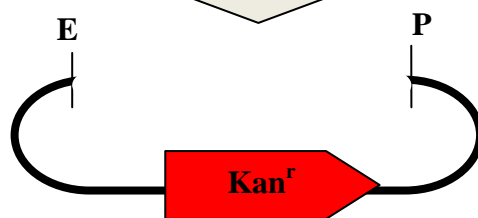
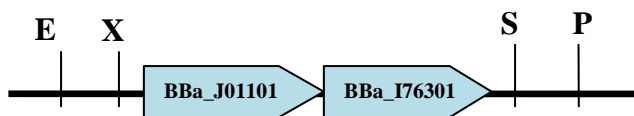
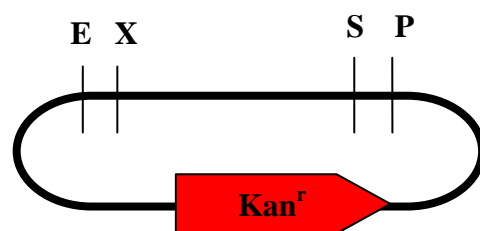
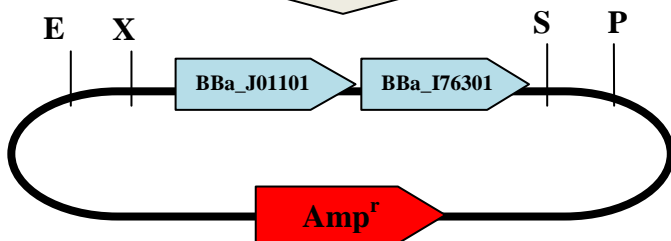
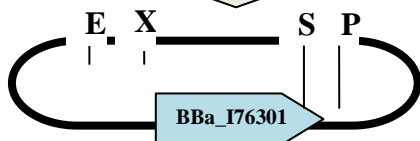
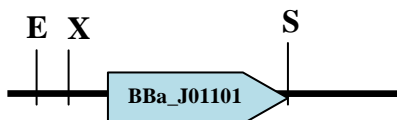
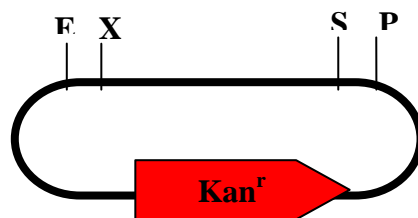
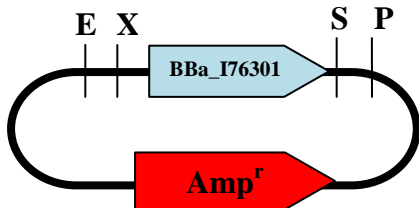
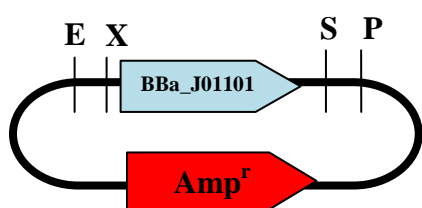
La ligación se hizo utilizando una proporción de 1:5 (vector – inserto) para lo cual se cuantificó en nanodrop obteniendo 13.05 ng/μl para BBa_I763011 (vector), 16.55 ng/μl para BBa_J01101 (inserto), se preparó una dilución tomando 1.21 μl de vector y aforando a 10 μl en ddH₂O en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Para el *mix* de ligación se utilizaron tubos de PCR colocando 1μl de BBa_I763011 y 0.5 μl de BBa_J01101, la reacción se incubó utilizando un termociclador Techne modelo Flexigene en el cual se programó una hora a 22°C y 20 minutos a 65°C este último ciclo para inactivar la enzima, la ligación se transformó por choque térmico y se sembró en cajas petrí previamente preparadas con placas de agar.

Una vez que se obtuvieron colonias con células transformantes para comprobar las ligaciones se utilizó miniprep como se detalla a continuación; se utilizaron 4 tubos eppendorf con capacidad de 1.5 ml los cuales se llenaron con 1 ml de cultivo celular, se centrifugaron a 15,000 rpm dos minutos decantando el sobrenadante, este paso se repitió tres veces por cada tubo hasta obtener una pastilla. Se agregaron 200 μl de solución Birboim I la pastilla se resuspendió en vortex y se dejó reposar diez minutos a temperatura ambiente, a continuación se adicionaron 300μl de solución Birboim II y se mezcló por inversión seis veces, los tubos se dejaron reposar 10 minutos en hielo, se adicionaron 225μl de solución Birboim III se homogenizó cuidadosamente por inversión, la mezcla se dejó reposar 10 minutos en hielo, se centrifugó a 15,000 rpm quince minutos. Con una pipeta de 100 μl se retiró el sobrenadante que fue colocado en tubos eppendorf de 1.5 ml estériles.

Se agregaron 600 μl de isopropanol cada muestra se incubó una hora a -20°C, los tubos se centrifugaron a 15,000 rpm 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregaron 500 μl de alcohol al 70% se centrifugó a 15,000 rpm 15 minutos se decantó y se seco al vacío a 45°C 15 minutos.

La pastilla se resuspendió en 30 μl de ddH₂O, se agrego 1μl de RNAsa la reacción se incubo a 37°C 30 minutos.



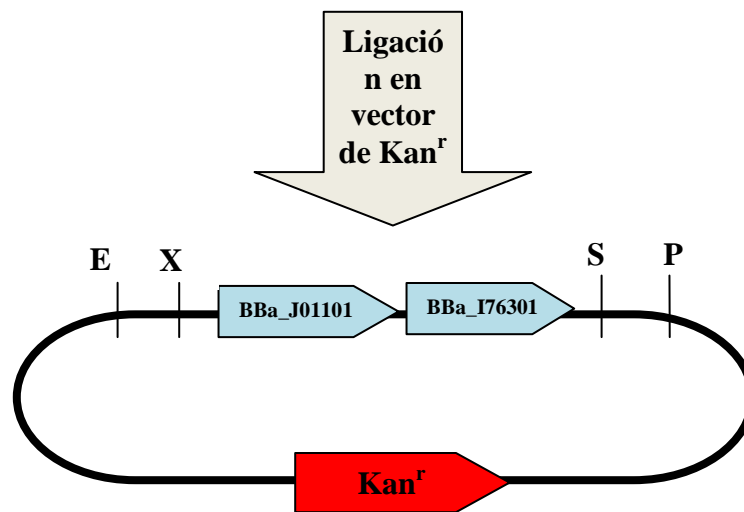


Fig 6. Armado del gen reportero y ligación en un vector con resistencia a kanamicina (Kan^r).

Para el experimento final se realizó un pre inóculo de 30 ml en medio LB utilizando 17 µg/ml de cloranfenicol y 20 µg/ml de kanamicina (estas dosis se conocen también como concentraciones de trabajo), se utilizaron cuatro tubos falcon de 50 ml (dos para cloranfenicol y dos para kanamicina), los tubos se mantuvieron 12 horas a 37 °C – 175 rpm.

Del preinóculo se tomaron alícuotas de 100 µl las cuales se transfirieron a 20 ml de medio LB líquido; se hicieron 24 inóculos por cada experimento y siete réplicas, la dosis de antibiótico se distribuyó en un gradiente de concentración, cada experimento se mantuvo 12 horas (*overnight*) a 37°C en agitación constante de 175 rpm.

La microscopía de fluorescencia se realizó con un microscopio trinocular Nikon optiphot-2 con iluminación difractada, las fotografías fueron tomadas con una cámara Sony cybershot de 4 megapíxeles a una distancia focal de 3.7 con un segundo de exposición.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó Sigma Plot para Windows V. 12.0

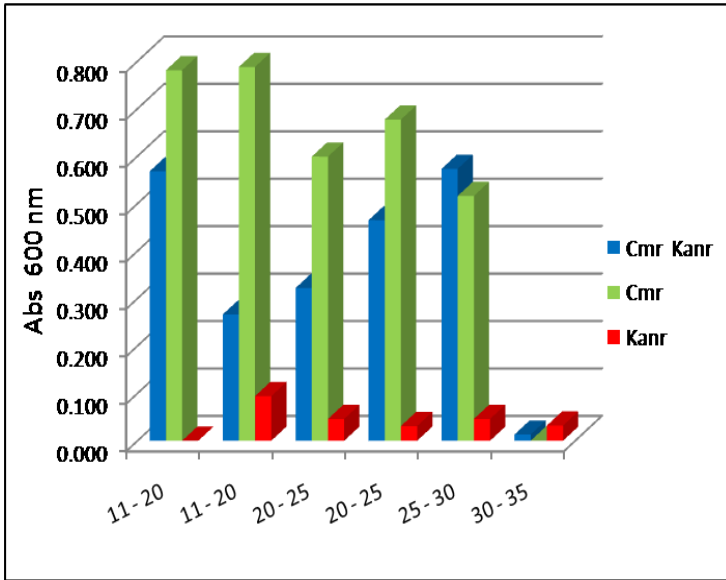
Al tubo falcon con el inóculo positivo para THG se adicionaron 5 ml de glicerol al 70% y se guardó en un hipercongelador a -80°C.



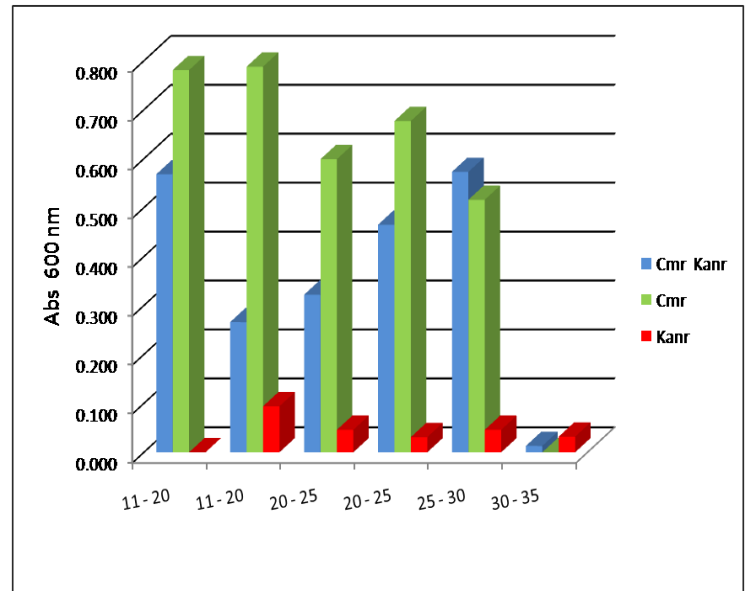
Fig 7. Inóculo positivo con una cepa de resistencia a Cloranfenicol y Kanamicina expuesto a un gradiente de concentración.

Resultados.

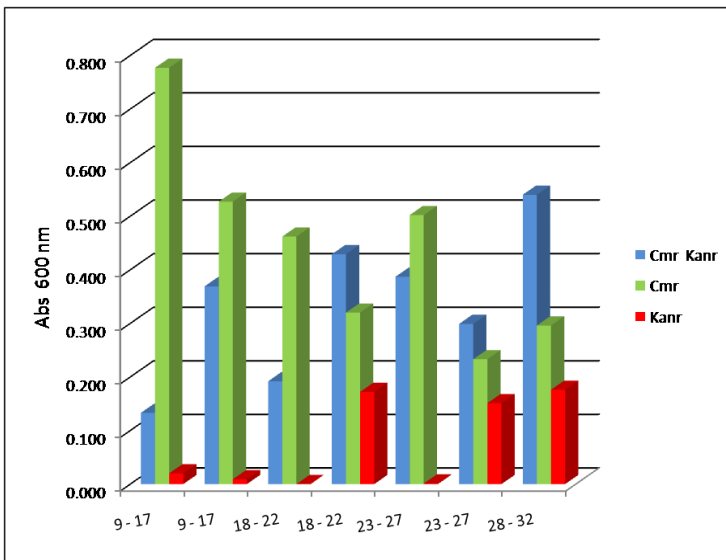
A)



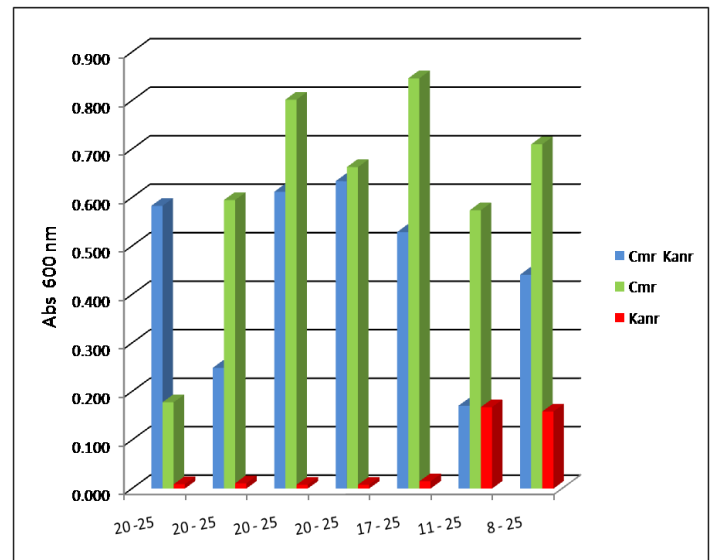
B)



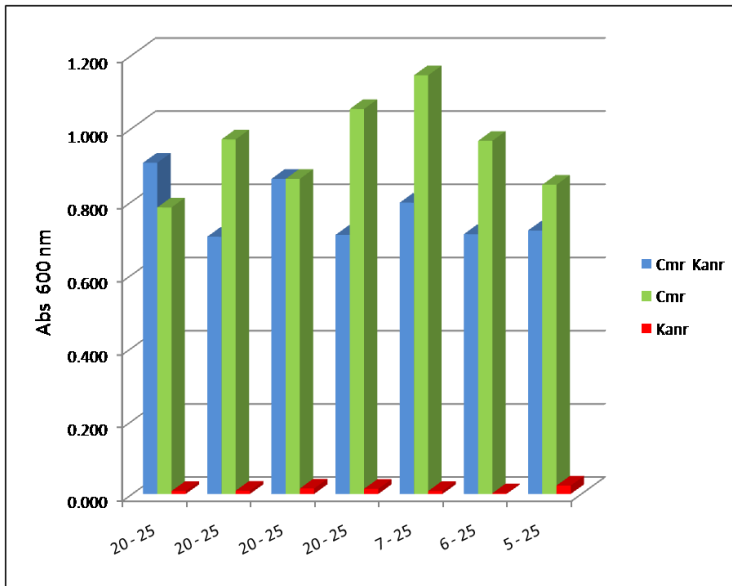
C)



D)



E)



F)

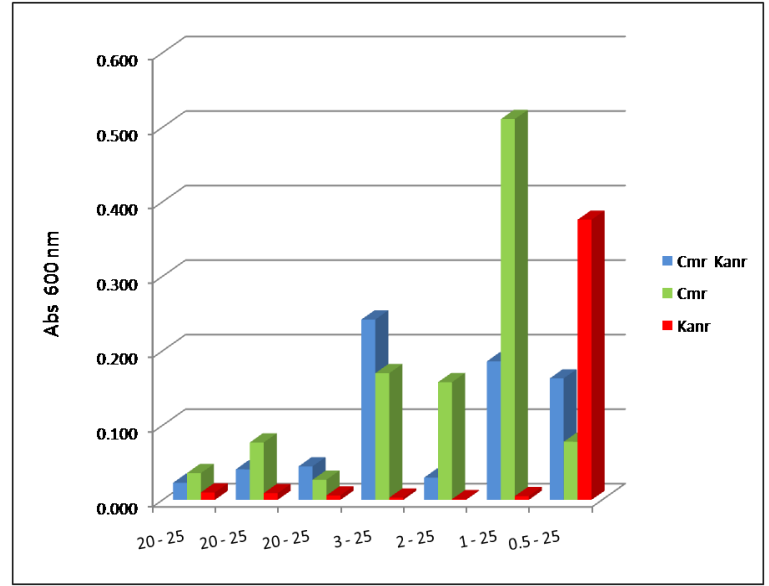


Fig. 8 Gráficas que muestran el crecimiento celular en cepas de *E. coli* transformadas con un vector de resistencia a cloranfenicol (Cm^r) y kanamicina (Km^r), la primera barra de cada agrupación muestra la interacción de ambas cepas expuestas al gradiente de concentración que se describe en el eje X, la segunda barra muestra el crecimiento de la cepa transformada con el vector con resistencia a cloranfenicol (Cm^r) y la tercera el crecimiento de la cepa transformada con el vector de resistencia a kanamicina (Km^r), las cantidades que se presentan en el eje X muestran la concentración utilizada en microgramos por mililitro la primera corresponde a la concentración de cloranfenicol (Cm), la segunda a la concentración de kanamicina (Km), en el eje Y se presenta la lectura tomada en un espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 600 nm.

Microscopía de fluorescencia.

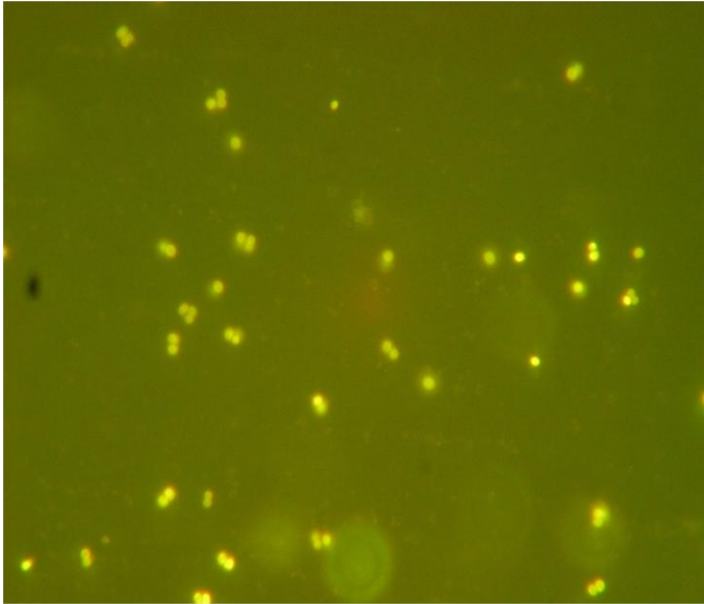


Fig. 9 Expresión de GFP en colonias transformantes, observación de microscopia de fluorescencia 100X.

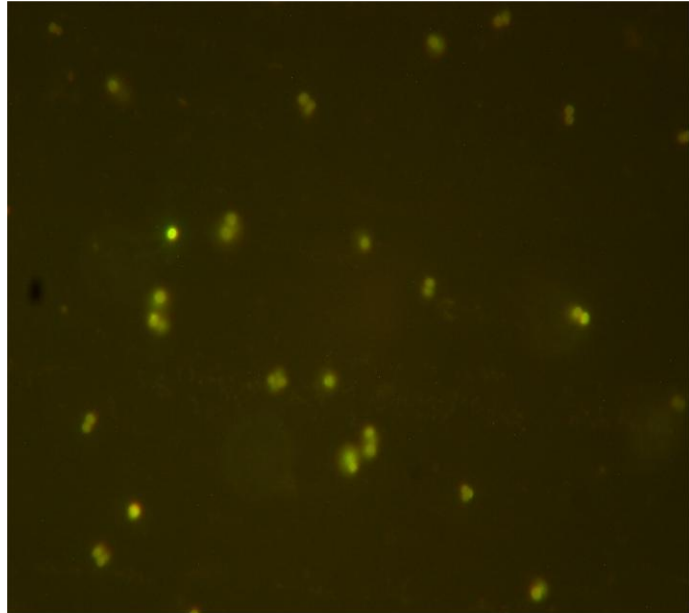


Fig. 10 Expresión de GFP en colonias transformantes, observación de microscopia de fluorescencia 100X (campo osbcuro)

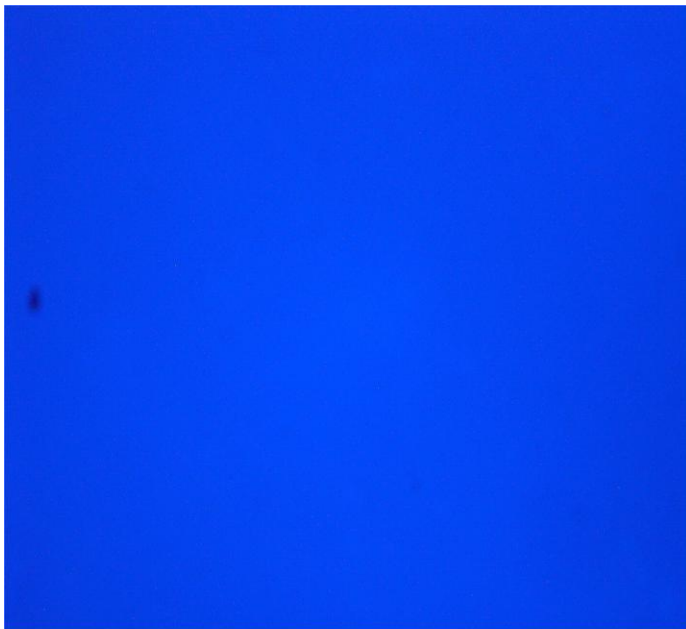


Fig. 11 Incidencia de luz violeta sobre el campo claro para descartar falsos positivos.

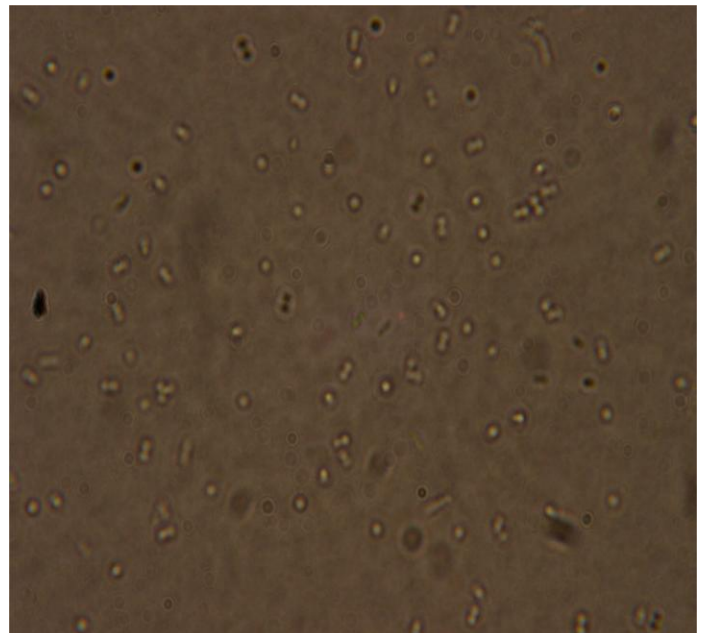


Fig. 12 Células transformantes en campo claro 100X.

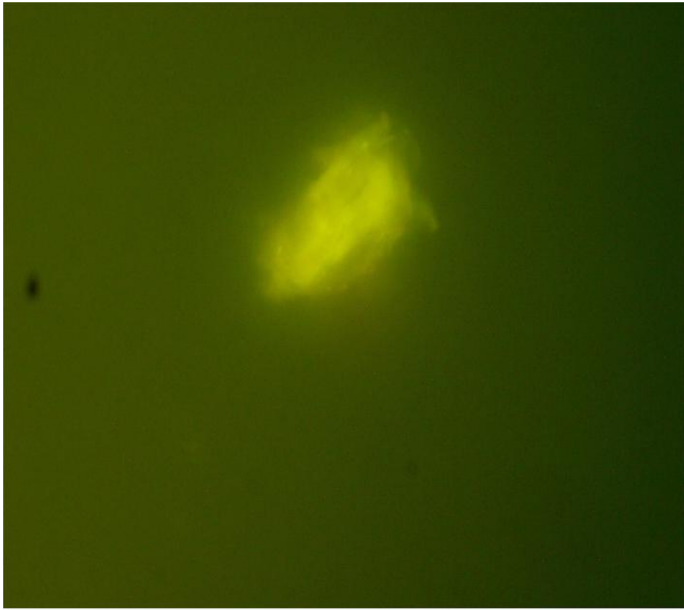


Fig. 13 Falso positivo, incidencia sobre campo fluorescente con lámpara azul turquesa 100 X.

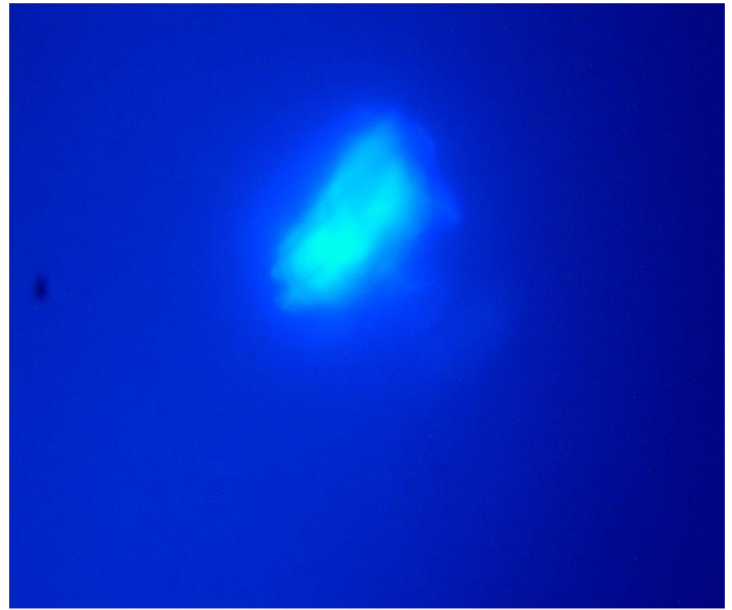


Fig. 14 Falso positivo, incidencia sobre campo fluorescente con lámpara violeta 100 X.

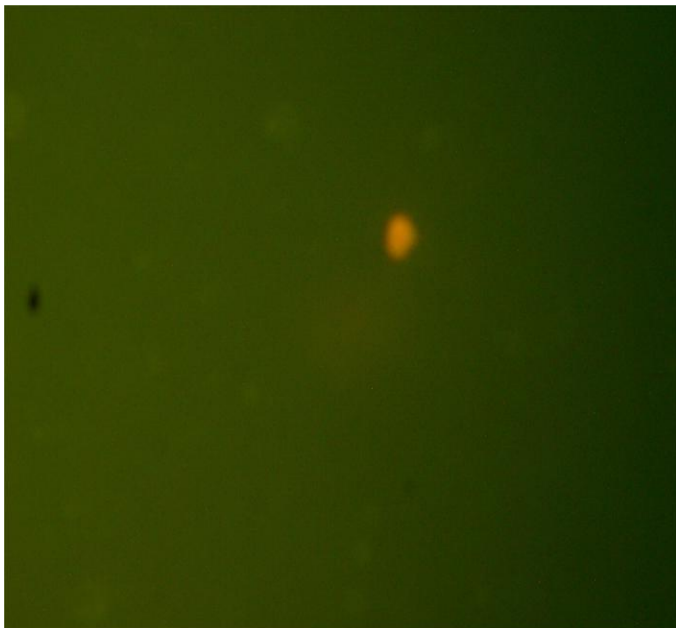


Fig. 15 Probable expresión de GFP disuelta en el medio por lisis inducida.

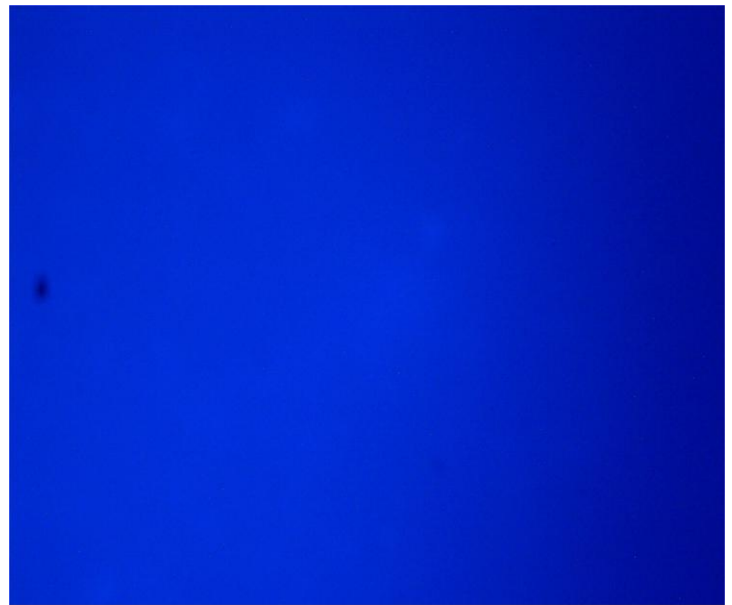


Fig. 16 Control negativo probable expresión de GFP disuelta en el medio por lisis inducida.

Dado que no existen en la literatura reportes sobre las condiciones en las cuales la THG puede ocurrir incorporando una presión de selección *in vivo*, se propuso para la primer serie de experimentos utilizar lo que en los protocolos de laboratorio se denomina “concentraciones de trabajo”, la barra en color azul de cada serie muestra la densidad óptica (DO) utilizando el marcador con resistencia a cloranfenicol y kanamicina, la barra color verde muestra la DO utilizando sólo el marcador con resistencia a cloranfenicol y la barra color rojo la DO del marcador con resistencia a kanamicina, los dos números que se muestran en eje de las X hacen referencia a las concentraciones que fueron utilizadas ej. 11-20 significa 11 microgramos por mililitro de cloranfenicol por 20 microgramos por mililitro de kanamicina la lectura del eje Y muestra la densidad óptica en una longitud de onda de 600 nm.

En la primer serie de experimentos (A) se observa el fuerte efecto inhibitorio que tiene el cloranfenicol en el crecimiento de los ensayos que incorporan sólo la resistencia a kanamicina, por otro lado en las barras de color verde se observa claramente como la kanamicina no inhibe el crecimiento de los ensayos que incorporan el marcador con resistencia a cloranfenicol el cual mantiene un crecimiento muy regular en los cinco primeros ensayos. Al observar el crecimiento marginal del sexto ensayo de izquierda a derecha decidimos mantener constante la concentración de kanamicina y disminuir la de cloranfenicol; de acuerdo a nuestra hipótesis inicial esperaríamos que una DO igual o muy parecida entre cloranfenicol y kanamicina generé una mayor frecuencia de THG.

En el segundo experimento (B) confirmamos las concentraciones letales correspondientes a 30 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y 35 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina por lo que se descartó como una concentración óptima de acuerdo con nuestro objetivo, sin embargo observamos un patrón constante en el crecimiento de los ensayos con resistencia a cloranfenicol y los ensayos que incorporan ambas resistencias, en este experimento la tercera replica de izquierda a derecha es donde identificamos el primer y único evento de THG de toda la serie.

En el tercer experimento (C) podemos observar la recuperación que tiene el vector con resistencia a kanamicina disminuyendo la concentración de cloranfenicol, contrario a lo que se muestra en el experimento (B) 0.032, la densidad óptica en (C) de 0.168 nos muestra una recuperación debido a la disminución en la concentración de cloranfenicol en dos puntos pasando de 30 a 28 microgramos por mililitro. El primer ensayo de la gráfica (C) muestra como el marcador con

resistencia a cloranfenicol tiene un crecimiento de 0.777 lo cual se justifica por la baja concentración utilizada (9 mg/ml), el resto muestra un crecimiento muy similar entre el marcador con resistencia a cloranfenicol y los ensayos que incorporan las ambas resistencias.

Llama fuertemente la atención la dinámica de crecimiento que muestra la gráfica E) en la cual no se observa una diferencia en la DO del marcador de resistencia a kanamicina y el marcador de resistencia a cloranfenicol, a pesar de la amplia diferencia que existe en la concentración de este último, por lo que sería deseable repetir esta serie de experimentos.

La gráfica (F) en el ensayo de barras número siete de izquierda a derecha muestra el crecimiento más alto de toda la serie (0.376) en el tubo con resistencia a kanamicina esto se justifica por la disminución que se realizó en la concentración de cloranfenicol, sin embargo en el ensayo número seis se observa una DO de 0.511, de acuerdo a nuestra hipótesis será necesario hacer más replicas utilizando un gradiente de concentración entre 0.5 y 1.0 microgramos por mililitro de cloranfenicol y 20-25 microgramos por mililitro de kanamicina ya que consideramos este intervalo en el gradiente como el óptimo para identificar eventos de THG.

La microscopía de fluorescencia (Fig. 9) muestra de forma contundente que ocurrió al menos un evento de THG, en el cual la secuencia del promotor se acoplo a la secuencia del reportero. La figura 10 muestra la incidencia de luz azul turquesa sobre el campo oscuro. Para descartar falsos positivos se hizo incidir un haz de luz violeta sobre la muestra (Fig 11).

La figura 13 muestra el ejemplo de un falso positivo el cual es un artefacto que presenta fluorescencia al incidir luz azul turquesa (Fig 13) y luz violeta.(Fig 14).

De acuerdo a las múltiples observaciones que se hicieron en el desarrollo de los seis experimentos la figura 15 muestra un artefacto específico es decir, al momento de incidir luz azul turquesa presenta fluorescencia, y al momento de cambiar por luz violeta la fluorescencia desaparece lo cual nos hace suponer que se trata de proteína GFP que permaneció en el medio como residuo por lisis inducida debido a la concentración de antibióticos que fue utilizada.

μ

Modelado.

El siguiente modelo constituye una aproximación teórica con el objetivo de analizar la ocurrencia de la THG utilizando los parámetros obtenidos de seis experimentos con ocho muestras cada uno, (48 muestras); dado que el único parámetro que se modificó fueron las concentraciones de antibióticos se establecieron las mismas condiciones de volumen, temperatura y agitación para todos los experimentos.

Análisis de Datos.

Debido a que las condiciones de volumen, temperatura y agitación son las mismas, para efectos del planteamiento se consideran como valores constantes.

Se modificaron las concentraciones de antibióticos, Cloranfenicol (C) así como de Kanamicina (K) , en cada una de las muestras, y se observó la ocurrencia de la THG en una sola muestra para los valores:

$$(C, K) = (20, 25)$$

Teniendo una frecuencia de 14 repeticiones para la misma pareja de valores.

Esto significa que podemos establecer de inicio, la probabilidad de ocurrencia de la THG de la siguiente manera:

$$P[THG] = \frac{1}{14} = 0.0208$$

Se elaboró la siguiente tabla para mostrar el número de repeticiones y resultados positivos de cada experimento.

| Puntos | C | K | Frecuencia | Número de Éxitos THG | P[THG] |
|--------|----|----|------------|----------------------|--------|
| 1 | 17 | 15 | 2 | 0 | 0 |
| 2 | 25 | 20 | 2 | 0 | 0 |
| 3 | 30 | 25 | 2 | 0 | 0 |
| 4 | 35 | 30 | 2 | 0 | 0 |
| 5 | 11 | 20 | 2 | 0 | 0 |
| 6 | 20 | 25 | 14 | 1 | 0.0208 |
| 7 | 25 | 30 | 2 | 0 | 0 |
| 8 | 30 | 35 | 2 | 0 | 0 |
| 9 | 9 | 17 | 2 | 0 | 0 |
| 10 | 18 | 22 | 2 | 0 | 0 |
| 11 | 23 | 27 | 2 | 0 | 0 |
| 12 | 28 | 32 | 2 | 0 | 0 |
| 13 | 17 | 25 | 1 | 0 | 0 |
| 14 | 14 | 25 | 1 | 0 | 0 |
| 15 | 11 | 25 | 1 | 0 | 0 |
| 16 | 8 | 25 | 1 | 0 | 0 |
| 17 | 7 | 25 | 1 | 0 | 0 |
| 18 | 6 | 25 | 1 | 0 | 0 |

| | | | | | |
|----|-----|----|----|---|---|
| 19 | 5 | 25 | 1 | 0 | 0 |
| 20 | 4 | 25 | 1 | 0 | 0 |
| 21 | 3 | 25 | 1 | 0 | 0 |
| 22 | 2 | 25 | 1 | 0 | 0 |
| 23 | 1 | 25 | 1 | 0 | 0 |
| 24 | 0.5 | 25 | 1 | 0 | 0 |
| | | | 48 | | |

Tabla 1. Presenta la concentración de antibióticos cloranfenicol (C) kanamicina (K) y ocurrencia de THG en cada muestra.

A fin de tener una representación gráfica de las concentraciones utilizadas en cada uno de los experimentos, se realizó la siguiente gráfica la cual muestra una dispersión en cuanto a la concentración utilizada.

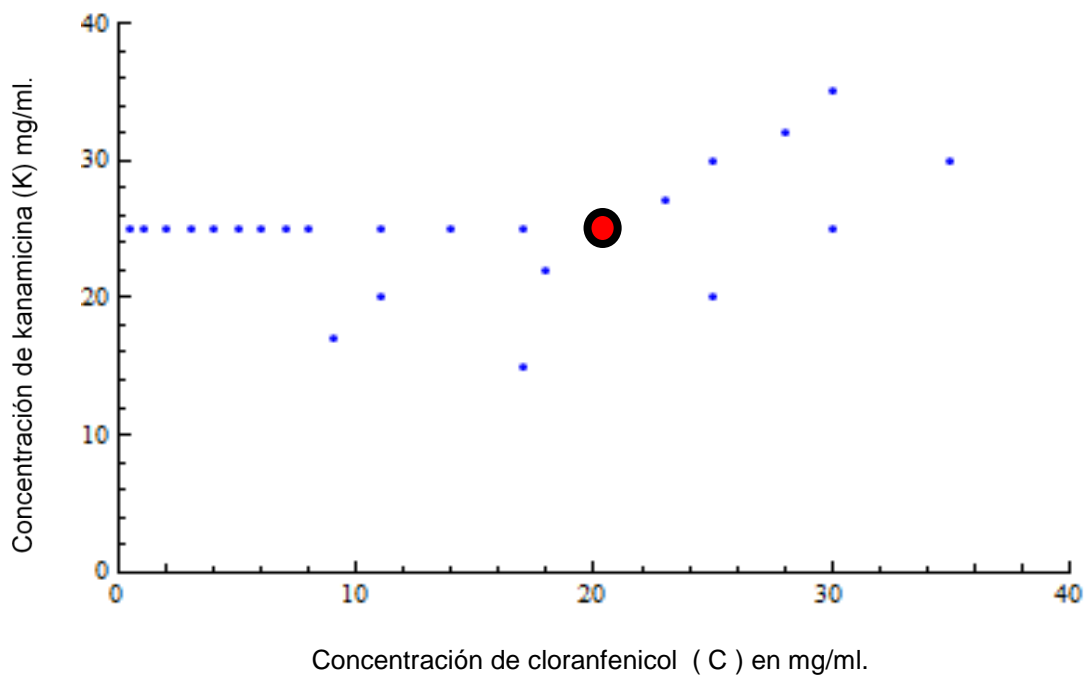


Fig. 17 Distribución en el plano considerando la concentración de cloranfenicol (C) en el eje X y de kanamicina (K) en el eje Y, el punto rojo en contorno oscuro representa el éxito.

La ocurrencia del THG también puede darse en regiones cercanas al punto:

$$(C, K) = (20, 25)$$

Por lo tanto, para definir una región en el plano que agrupe a las parejas (C, K) que ofrezcan mayores probabilidades de ocurrencia de la THG (Éxito E), descartemos a la región donde sabemos que NO ocurre, y tomaremos como punto de referencia a $(C, K) = (20, 25)$, para construir el modelo desde estas coordenadas.

Construcción Matemática.

Supongamos que tenemos a los siguientes conjuntos de datos:

$$C = \{x_i : i = 1, \dots, n\}$$
$$K = \{y_i : i = 1, \dots, n\}$$

Tal que, con ellos formamos la siguiente distribución:

$$D = \{(x_i, y_i) : x_i \in C, y_i \in K\}$$

Ahora, uno de los elementos del conjunto D , tiene la particularidad de generar un E , por lo cual le llamaremos:

$$(x_e, y_e)$$

Definimos a la distancia óptima de éxito en dirección del eje x como:

$$d_x = \min_{i=1, \dots, n} \{|x_i - x_e| : x_i \neq x_e\}$$

Y a la distancia óptima de éxito en dirección del eje y como:

$$d_y = \min_{i=1, \dots, n} \{|y_i - y_e| : y_i \neq y_e\}$$

Entonces definimos a la Región Óptima de Éxito como el conjunto:

$$R_e = [x_e - d_x, x_e + d_x] \times [y_e - d_y, y_e + d_y]$$

Construcción adaptada a nuestros datos.

En la tabla 1, ya se sabe explícitamente quiénes son los conjuntos C y K . Además se conoce cuál es su distribución D mostrada en la gráfica.

En nuestro caso renombraremos a la pareja que presentó el éxito, con la finalidad de adaptarla a la construcción:

$$(x_e, y_e) = (20, 25)$$

De esta manera, ya podemos calcular d_x y d_y .

| Puntos | C | K | $ x_i - x_e $ | $ y_i - y_e $ |
|--------|-----|----|---------------|---------------|
| 1 | 17 | 15 | 3 | 10 |
| 2 | 25 | 20 | 5 | 5 |
| 3 | 30 | 25 | 10 | |
| 4 | 35 | 30 | 15 | 5 |
| 5 | 11 | 20 | 9 | 5 |
| 6 | 20 | 25 | | |
| 7 | 25 | 30 | 5 | 5 |
| 8 | 30 | 35 | 10 | 10 |
| 9 | 9 | 17 | 11 | 8 |
| 10 | 18 | 22 | 2 | 3 |
| 11 | 23 | 27 | 3 | 2 |
| 12 | 28 | 32 | 8 | 7 |
| 13 | 17 | 25 | 3 | |
| 14 | 14 | 25 | 6 | |
| 15 | 11 | 25 | 9 | |
| 16 | 8 | 25 | 12 | |
| 17 | 7 | 25 | 13 | |
| 18 | 6 | 25 | 14 | |
| 19 | 5 | 25 | 15 | |
| 20 | 4 | 25 | 16 | |
| 21 | 3 | 25 | 17 | |
| 22 | 2 | 25 | 18 | |
| 23 | 1 | 25 | 19 | |
| 24 | 0.5 | 25 | 20 | |
| | | | 2 | 2 |

Tabla 2. Determinación de d_x y d_y que forman la distancia respecto al punto de éxito.

De acuerdo a la tabla anterior:

$$\begin{aligned}d_x &= 2 \\d_y &= 2\end{aligned}$$

Por lo tanto:

$$\begin{aligned}R_e &= [20 - 2, 20 + 2] \times [25 - 2, 25 + 2] \\&= [18, 22] \times [23, 27]\end{aligned}$$

Ahora, es tiempo de llevar ésta información a nuestra dispersión de datos, observe que la parte interna de la región R_e , justamente nos indica los valores posibles para las concentraciones que tengan mayor probabilidad de generar un éxito.

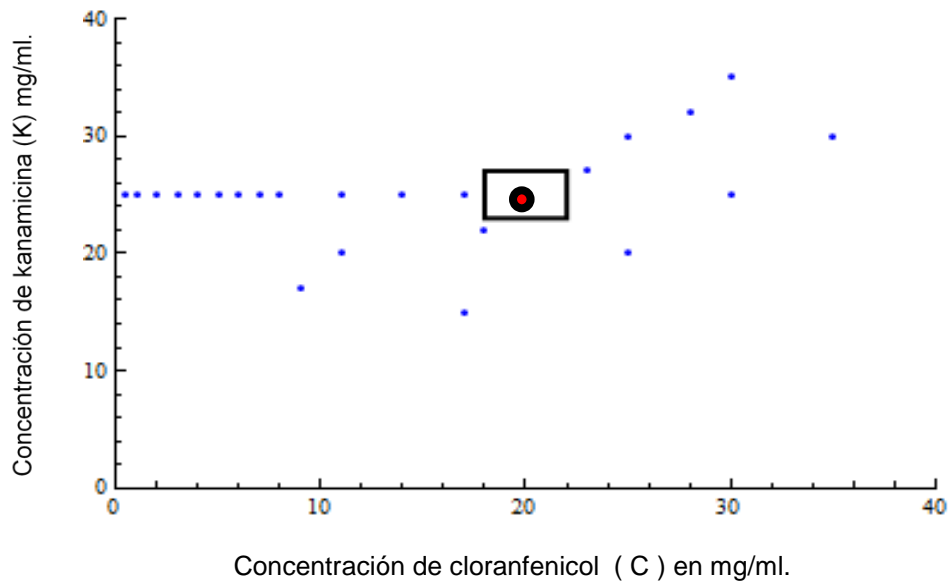


Fig. 18 Distribución en el plano de la región óptima de éxito.

Inclusión de la probabilidad de ocurrencia del evento.

Hasta ahora, hemos hablado únicamente acerca de los datos referentes a C y K . Es el momento de incluir en nuestra construcción la probabilidad de ocurrencia de una THG. En base a la primera tabla 1, podemos asignarle una probabilidad de ocurrencia a cada pareja (x_i, y_i) .

Ahora bien, también es necesario incluir el factor de tiempo, ya que además de todo, la ocurrencia de la THG no depende sólo de las concentraciones, sino que también del tiempo.

Definamos entonces a la ocurrencia o no, de la THG como una función que depende de las concentraciones de C y K y del t .

Sea $S = [18,22] \times [23,27] \times [0, \infty]$ nuestro espacio muestra. Definimos a la Variable Aleatoria (VA), como la función que asocia al espacio muestra S con el conjunto $[0,1]$. Si la función adquiere el valor de cero, significa que NO ocurrió la THG, si la función adquiere el valor de uno, significa que SI ocurrió la THG, si la función vale entre cero y uno significa que la ocurrencia del THG tuvo esa probabilidad.

$$X: S \rightarrow [0,1]$$

El subconjunto de S que no genera la ocurrencia es

$$X^{-1}(\{0\})$$

Y el que si genera la ocurrencia es:

$$X^{-1}(\{1\})$$

Suele denotarse a dichos subconjuntos de la siguiente manera

$$\begin{aligned} X^{-1}(\{0\}) &= [X = 0] \\ X^{-1}(\{1\}) &= [X = 1] \end{aligned}$$

En otras palabras, el subconjunto $[X = 1] \subseteq S$, es el que encierra la información que genera la ocurrencia TOTAL de la THG.

Sea $\wp(S) = \{E: E \subseteq S\}$ el conjunto cuyos elementos, son todos los subconjuntos posibles del espacio muestra, denominado conjunto potencia. Observe que $[X = 1] \in \wp(S)$

Definimos entonces al espacio de probabilidad como, la agrupación del espacio muestra, los posibles eventos y la función de probabilidad de tales eventos:

$$(S, \wp(S), P)$$

Con estas herramientas ya podemos hablar de ciertos resultados que se obtuvieron experimentalmente.

Al principio se mencionó que $P[THG] = 0.0208$, dato que se obtuvo experimentalmente, el valor se obtuvo con las concentraciones:

$$(x_e, y_e) = (20, 25)$$

A un tiempo $t = 10hr$. Si llevamos ésta información a nuestro modelo, tenemos que:

$$(20, 25, 10) \in [X = 0.0208] \subseteq S$$

Esto significa, que el elemento $(20, 25, 10)$ generó que $P[THG] = 0.0208$. Claramente no es el único elemento que provoca tal efecto, ésa es la razón por la que encerramos a TODOS los elementos de S que generan $P[THG] = 0.0208$ en el conjunto:

$$[X = 0.0208]$$

La gráfica mostrada reporta el avance, muestra la distribución inicial, la región óptima de éxito, y el valor que adquiere la función X para el elemento $(20, 25, 10)$.

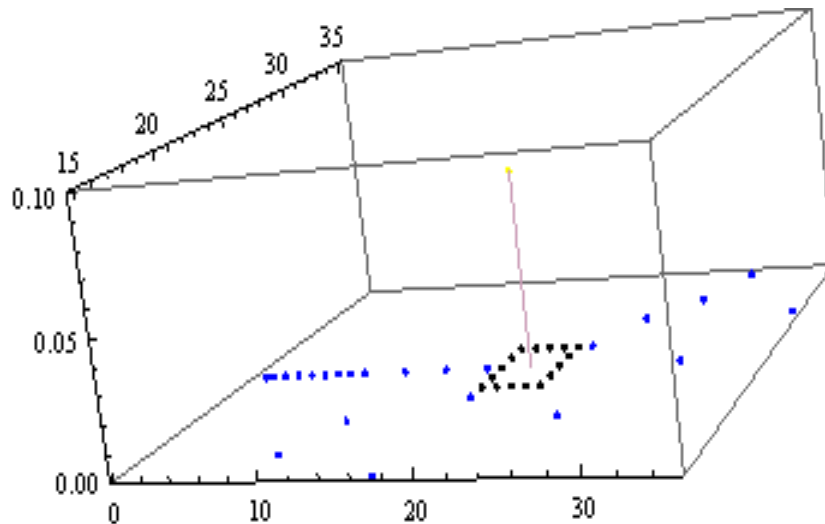


Fig 19. Representación gráfica que muestra la correlación entre concentraciones de kanamicina y cloranfenicol incorporando una variable de tiempo estimada en 10 horas.

En base a la experiencia, se establece como hipótesis nula una $t = 6hr$, se tiene una probabilidad de ocurrencia total con las concentraciones $(x_e, y_e) = (20, 25)$. Entonces usando nuestra nomenclatura, escribimos ésta información como sigue

$$(20, 25, 6) \in [X = 1]$$

Nuestro objetivo es, establecer la distribución que tiene la Variable Aleatoria X . Para lograr esto, claramente hacen falta más datos, sin embargo es posible manejarlo en forma teórica.

Podemos comenzar con suponer que las concentraciones se mantienen fijas el tiempo varía, y que la distribución generada es la normal en una dimensión. Entonces, desde este punto de vista podemos asumir:

$$\begin{aligned}P[(20,25,6)] &= 1 \\P[(20,25,10)] &= 0.0208\end{aligned}$$

De ésta forma, podemos establecer la siguiente función de probabilidad

$$f(t) = P[(20,25, t)] = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

Con μ la media y σ la desviación estándar, y entonces, al ocupando la información ya mencionada:

$$\begin{aligned}f(6) &= 1 \\f(10) &= 0.0208\end{aligned}$$

Podemos deducir la desviación estándar y la media para tener explícitamente a la función $f(t)$.

Las ecuaciones quedan:

$$\begin{aligned}\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(6-\mu)^2}{2\sigma^2}} &= 1 \\ \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(10-\mu)^2}{2\sigma^2}} &= 0.0208\end{aligned}$$

Al dividir las obtenemos:

$$\frac{\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(10-\mu)^2}{2\sigma^2}}}{\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(6-\mu)^2}{2\sigma^2}}} = 0.0208$$

Entonces:

$$\frac{e^{-\frac{(10-\mu)^2}{2\sigma^2}}}{e^{-\frac{(6-\mu)^2}{2\sigma^2}}} = 0.0208$$

Simplificando por exponentes y aplicando logaritmo natural:

$$(6 - \mu)^2 - (10 - \mu)^2 = 2\sigma^2 \ln(0.0208)$$

Desarrollando algebraicamente y despejando μ obtenemos:

$$\mu = \frac{\sigma^2 \ln(0.0208)}{4} + 8$$

Significa que para conocer la media necesitamos primero la desviación estándar, en donde ambas se encuentran relacionadas de la manera mostrada.

Podemos tener a la desviación estándar en función de la media

$$\sigma = \sqrt{\frac{4(\mu - 8)}{\ln(0.0208)}}$$

Ahora, juntando esta nueva información en la función $f(t)$ propuesta, nos damos cuenta que ahora solo basta conocer la media del experimento:

$$f(t) = \frac{1}{\sqrt{\frac{4(\mu - 8)}{\ln(0.0208)}} \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t-\mu)^2}{2\sqrt{\frac{4(\mu-8)}{\ln(0.0208)}}^2}}$$

Simplificando:

$$f(t; \mu) = \frac{1}{\sqrt{\frac{8\pi(\mu - 8)}{\ln(0.0208)}}} e^{-\frac{(t-\mu)^2 \ln(0.0208)}{8(\mu-8)}}$$

Entendiendo a ésta función como la función que nos genera los valores experimentales:

$$P[(20,25,6)] = 1, P[(20,25,10)] = 0.0208$$

Como la descripción del comportamiento normal que se piensa tiene la ocurrencia de la THG a un tiempo t (para $(x_e, y_e) = (20,25)$).

Como ya se había mencionado, es claro que hacen falta más datos para dar respuestas más claras a nuestra investigación, es necesario determinar si existe correlación entre las concentraciones C , K y el tiempo t , con la finalidad de poder establecer una función que involucre a las entradas de los elementos de $S = [18,22] \times [23,27] \times [0, \infty]$ entre si, y entonces saber los valores para C , K y el tiempo t que provoquen $P[X = 1] = 1$.

Con esto se logra conocer la función de probabilidad:

$$F(x) = P[X = x]$$

Finalmente, la gráfica que nos representa al comportamiento de:

$$(20,25,10) \in [X = 0.0208] \subseteq S = [18,22] \times [23,27] \times [0, \infty]$$

Se presenta de la siguiente forma:

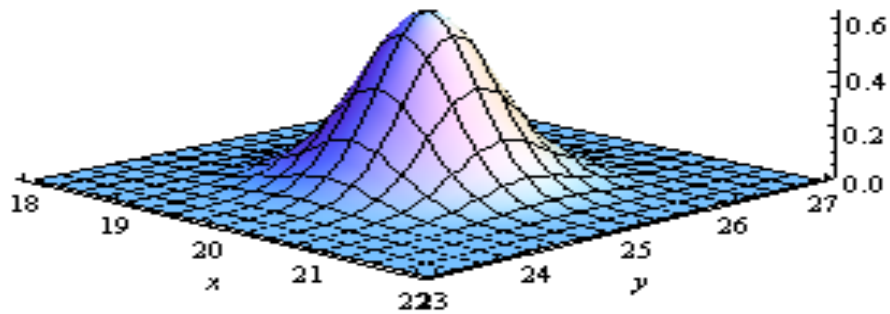


Fig. 20. Representación gráfica en 3D de una distribución normal tomando como parámetros concentraciones de antibióticos en el plano (X, Y) el eje Z esta representado por el tiempo.

Discusión.

Los eventos de THG pueden tener amplios efectos no sólo en el tamaño y estructura de la información genética sino también en la capacidad de adaptación a condiciones ambientales novedosas, quizá el ejemplo más significativo lo encontramos en la posibilidad de sobrevivir gracias a la adquisición de resistencia a antibióticos y la amplia evidencia reportada sobre la aparición de islas de patogenicidad atribuida a eventos de THG entre especies distantes filogenéticamente, otro ejemplo es la capacidad para degradar compuestos aromáticos a partir de eventos de THG. Sin embargo la incorporación de DNA exógeno también puede tener un efecto negativo en el hospedero alterando la estructura y función de proteínas esenciales, esto puede traducirse en un fenómeno potencialmente letal. Un elemento importante es la forma en que el material genético se encuentra disponible en el medio que rodea a la célula, en general se asume que durante el ciclo de vida de organismos procariontes el DNA puede quedar disponible como resultado de lisis espontánea o por la acción de bacteriófagos, en este sentido cada ambiente es diferente debido al contenido de nucleasas, proteasas, sales entre otros agentes que pueden incidir en la calidad del DNA y en su disponibilidad para ser incorporados como información genética potencialmente adaptativa a una célula hospedera, un ejemplo de esto lo encontramos en ambientes marinos donde se ha reportado DNA en concentraciones de varios microgramos por mililitro (Lorenz y Aardema, 1988). Al diseñar un método experimental *in vitro* muchos de estos factores permanecen constantes; variables tales como temperatura, PH, salinidad, disponibilidad de luz, nutrientes etc, permiten una aproximación real al fenómeno y a las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la movilización de información genética ya que dichas variables pueden ser totalmente controlables asignándoles un peso específico en el diseño experimental.

Contar con una metodología experimental permitirá estudiar e incorporar elementos que permitan cuantificar el fenómeno es importante desde el punto de vista evolutivo ya que podremos obtener parámetros reales sobre su incidencia así como el peso que pueden tener en reconstrucciones filogenéticas al mismo tiempo evaluar su importancia al ser un fenómeno generador de variabilidad.

La evidencia acumulada sobre sus implicaciones como un problema de salud pública requieren de metodologías experimentales que permitan conocer más y mejor sobre la formación de islas de patogenicidad, adquisición de resistencia y la evolución de estos en el tiempo.

La utilización de un gradiente de antibióticos en medio líquido es un recurso que permite simular un microambiente incorporando una presión de selección, la respuesta al estrés derivada de concentraciones induce al organismo a utilizar todos los elementos a su disposición en un “recurso” de sobrevivencia incluyendo la asimilación de material genético exógeno. La dinámica de crecimiento medida en términos de densidad óptica nos proporciona un perfil de cómo la THG puede actuar no sólo a nivel de fenotipo, sino también como un elemento de supervivencia.

A fin de conocer si las dosis de antibióticos utilizadas tienen un efecto en el tratamiento se seleccionó una prueba estadística denominada prueba de Wilcoxon para datos pareados, en esta prueba se compararon los valores del crecimiento de una cepa control en un medio líquido sin antibiótico contra el crecimiento de las dos cepas de *E. coli* transformadas, y expuestas al tratamiento de ambos antibióticos (cloranfenicol y kanamicina). Los valores arrojados por la prueba [$t=13.151$ (replica 1) y $t=21.553$ (replica 2)] ambos con 13 grados de libertad (apéndice 7) indican un cambio significativo que permite descartar que el crecimiento obtenido del control contra los tratamientos se deba al azar; es decir los antibióticos tienen un efecto directo en el crecimiento con lo que podemos afirmar que se encuentran actuando como una presión de selección.

La fig. 8 A) primera serie de barras de izquierda a derecha muestra el crecimiento que fue tomado como punto de referencia en el cual se utilizaron concentraciones de antibióticos reportadas como “concentraciones de trabajo” (Cm^r 17mg/ml, Kan^r 15 mg/ml) esto nos permitió una aproximación sobre la dosis necesaria a fin de conocer los niveles óptimos para obtener eventos de THG. Las graficas Fig 8 A) - F) muestran una marcada discrepancia entre el crecimiento de las cepas resistentes a cloranfenicol y kanamicina. Debido al alto componente estocástico del fenómeno y el tiempo de expresión máximo de la proteína GFP, fue necesario ajustar la dosis de cloranfenicol en orden descendente con el objeto de obtener un crecimiento homogéneo, entre las cepas con resistencia a kanamicina y las cepas con resistencia a cloranfenicol el efecto de este ajuste se observa claramente en la séptima serie de barras de la gráfica en la fig.8 – F) en el cual la dosis para la cepa resistente a kanamicina (0.5 mg/ml) muestra una marcada recuperación obteniendo una DO (densidad óptica) igual a 0.376 contra una DO media de 0.067 de las 43 réplicas restantes, lo anterior se apoya en el mecanismo de acción que califica al cloranfenicol como un fuerte inhibidor de la síntesis de proteínas (Hahn, 1955), tomando en cuenta esta propiedad y de acuerdo a la hipótesis planteada esperaríamos que una dosis entre 0.5 y 1.0 microgramos por

mililitro de cloranfenicol en condiciones homogéneas de crecimiento genere suficiente presión de tal forma que sea posible detectar y cuantificar eventos de THG.

Desde su descubrimiento a principios de la década de los sesenta la proteína verde fluorescente (GFP) pasó de ser una simple curiosidad a una herramienta útil en biología molecular, sus propiedades físicas y químicas como un fluoroforo le permiten ser utilizada como reportero obteniendo una señal la cual puede ser analizada y cuantificada en diferentes niveles de expresión, en la actualidad se utiliza en biosensores celulares, en experimentos de resonancia energética de fluorescencia (FRET), resonancia energética en transferencia de bioluminiscencia (BRET), como marcador en experimentos de mutagenesis dirigida etc (Roda, 2010), de acuerdo a los parámetros reportados para el gen reportero que fue seleccionado en la serie de experimentos reportados en el presente trabajo la GFP alcanza su máximo nivel de expresión (pico de expresión) a los 85 minutos después de su inducción con un tiempo de vida estimado de dos horas, http://partsregistry.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_I13522, dados los parámetros anteriores y de acuerdo con el diseño experimental, no podemos descartar que se hayan dado eventos de THG en otras réplicas los cuales no fueron identificados oportunamente, lo anterior se apoya en las figuras 15 y 16 en las cuales se alcanzan a observar residuos de GFP, a estas muestras se les aplicó una prueba de luz violeta que en microscopía de fluorescencia se utiliza para descartar falsos positivos, obteniendo imágenes específicas de GFP, es decir se trata de residuos de proteína verde fluorescente. Dadas las condiciones del diseño experimental y la exposición de las células a concentraciones sub letales de antibióticos suponemos que dichas células mantuvieron una expresión de GFP que posteriormente debido a un proceso de lisis inducida quedó expuesta al medio.

La frecuencia y los mecanismos por medio de los cuales se da la THG difiere no sólo entre especies sino entre nichos ecológicos y dominios taxonómicos. Lawrence y Ochman estimaron que en el caso de *Escherichia coli* ha capturado y asimilado en su historia evolutiva del orden de 64.2 kilobases de información genética por millón de años sólo a través de eventos de THG esto equivale a 1.4% de la información genética total; de dicha estimación al menos 16 kilobases por millón de años se ha fijado, sin embargo la THG no es un fenómeno exclusivo de organismos procariontes aunque en mucha menor intensidad organismos eucariontes también se encuentran expuestos, un ejemplo que se ha reportado es en DNA de transferencia (DNAt) o por infección

retroviral, estos mecanismos pueden introducir nuevas secuencias de genes en la líneas germinales la cual posteriormente se hereda en forma vertical (Bushman, 2002).

Una de las vertientes más interesantes de la THG es su papel en las primeras etapas de la vida. La idea de un mundo de RNA de Orgel, Crick y Woese (Joyce, 1996) versa sobre la premisa de que el RNA fue la primera molécula capaz de almacenar información genética y llevar a cabo funciones catalíticas, esta idea se ha fortalecido en recientes años con el descubrimiento de RNA catalítico en intrones móviles, RNasa P, y más recientemente en ribosoma (Kruger, et al, 1982). Sin embargo la información genética en la actualidad esta constituida por DNA molécula químicamente más estable en su interacción con el agua que el RNA, esto plantea la interrogante de cómo fue la transición de un mundo de RNA a un mundo de DNA. Una clave puede ser la homogeneidad; con algunas excepciones el código genético es universal existe una gran similitud en la maquinaria para síntesis de proteínas a nivel transcripcional, y enzimas del metabolismo central, esto sugiere una fuerza actuando en las primeras etapas de la formación de un mundo de DNA, es en este punto donde la THG cobra importancia, en sus inicios el RNA debió de haber sido una molécula corta no más de un par de cientos de pares de bases y al mismo tiempo inestable, las primeras moléculas catalíticas debieron de haber tenido la capacidad de retrotranscribir RNA a pequeñas secuencias de DNA, la transferencia lateral de estas pequeñas cadenas o secuencias de material genético habría constituido una de las principales fuerzas para la organización y adecuación de lo que hoy conocemos como DNA en células primigenias.

Otra línea de razonamiento sobre el intenso intercambio de información genética en las primeras etapas de un mundo de DNA tiene que ver con la cantidad de información genética acumulada, por ejemplo los humanos contamos con aproximadamente 3.4 mil millones de de pares de bases total en el genoma por el contrario especies de la familia *Liliaceae* (plantas angiospermas de uso ornamental) tiene información genética diez veces más robusta es decir alrededor de 36 mil millones de pares de bases esta enorme discrepancia es poco probable que se haya acumulado por duplicación, o síntesis de DNA *de novo* lo anterior sugiere un fuerte intercambio y acumulación de información genética que ha delineado el patrón que observamos en la actualidad.

Existe amplia información sobre la THG como un problema de salud pública, tema que se ha abordado al inicio del presente trabajo, sin embargo el síndrome de inmunodeficiencia adquirida constituye un ejemplo extremo de cómo la THG pueden tener graves consecuencias. El VIH como

lo conocemos en la actualidad se originó en animales posteriormente infectó a monos y eventualmente a seres humanos, la estrategia de infección incluye una retrotranscriptasa y la integración de DNA complementario (DNAc) en el genoma hospedero, en este punto el VIH es capaz de adoptar un estado de inactividad lo cual tiene como resultado la evasión del sistema inmune en un estado de latencia, en las primeras semanas la concentración de RNA viral en el plasma sanguíneo puede alcanzar hasta 10 millones de copias por mililitro, después de un par de semanas esta concentración disminuye como consecuencia de la respuesta inmune a esto se le denomina periodo de latencia clínica esta etapa puede ser muy corta pero en algunos casos puede durar décadas, en algunos casos las diferentes tasas a las cuales progresa la enfermedad puede ser atribuida a características específicas del paciente infectado con el virus pero en la mayoría de los casos no tiene explicación.

Conclusiones.

La biología sintética puede ser una herramienta útil para abordar preguntas de carácter básico, de la misma forma es posible plantear una construcción sintética que permita detectar y cuantificar eventos de THG *in vitro*.

Contrario a lo que afirman algunos autores que califican a la THG como un fenómeno aislado con un impacto marginal en la información genética; el presente trabajo muestra que la THG ocurre y que puede llegar a tener fuertes implicaciones evolutivas. La propuesta experimental del presente trabajo se une a la gama de protocolos, análisis bioinformáticos, análisis estadísticos, y sienta un precedente sobre su estudio aplicando una metodología que incorpora, una presión de selección y un modelo de cuantificación en función del tiempo

La modelación matemática y la simulación *in silico* son herramientas que complementan los resultados experimentales y pueden convertirse en un poderoso recurso si se obtienen parámetros con mayor precisión.

Bibliografía.

- A. Medrano, G. Moreno, P. Vinuesa, A. Christen, J. C., 2004. Successful Lateral Transfer Requires Codon Usage Compatibility Between Foreign Genes and Recipient Genomes. *Biology Molecular & Evolution.*, 21(10), pp.1884-1894.
- Andrianantoandro, E. & Basu., 2006. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Molecular systems biology*, 2, p.2006.0028.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M.M.M., 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine.*, 79(2), p.137.158.
- Bansal, MS. Banay, G. Gogarten, JP. Shamir, R., 2011. Detecting Highways of Horizontal Gene Transfer. *Journal of computational biology.*, 18(9), pp.1087-1114.
- Benner., 2011. Synthetic biology, tinkering biology, and artificial biology. What are we learning? *Comptes Rendus Chimie*, 14(4), pp.372-387.
- Bushman, F., 2002. *Lateral DNA Transfer Mechanisms and Consequences*. First Edit. F. Bushman, ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Byrd, D.R. & Matson, S.W., 1997. MicroReview Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase. *Molecular Microbiology*, 25, pp.1011-1022.
- Calendar, R., 2006. *The bacteriophages* Second Edi. O. University, ed., New York: Oxford University Press Inc.
- Canton, B. & Labno., 2008. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices. *Nature biotechnology*, 26(7), pp.787-93.
- Craig, L., Volkmann, N. & Arvai., 2006. Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Molecular cell*, 23(5), pp.651-62.
- Cédéric Feschote, E.J.P., 2007. DNA Transposons and the evolution of Eukaryotic Genomes. *Annu Rev Genet.*, 41(5), pp.331-368.
- Davies, J.E., 2007. Origins, Acquisition and Dissemination of Antibiotic Resistance Determinants. In *Ciba Foundation Symposium 207 - Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread*. John Wiley & Sons, Ltd., pp. 15-35.
- Davies, Julian & Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews.*, 74(3), pp.417-33.
- Dirk, J. & Turner., 2003. Horizontal Gene Transfer in the Phytosphere. *New Phytologist*, 157(3), pp.525-537.

- Doolittle, W.F. & Orgel, L.E., 2011. Phylogenetic Classification and Tree Universal From comparative. *Advancement Of Science*, 284(5423), pp.2124-2128.
- Dorman, C.J., 2007. H-NS, the genome sentinel. *Nature Reviews Microbiology*, 5, pp.157-161.
- E. Paget, Simonet, P., 1994. On the track of natural transformation in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 15(1-2), pp.109-117.
- Faruque, SM. Nair, G., 2002. Molecular Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Immunology*, 46(2), pp.59-66.
- Frost, L.S. & Leplae., 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9), pp.722-32.
- Gogarten, J.P. & Fournier., 2007. Gene Transfer and the Reconstruction of Life's Early History from Genomic Data. *Space Science Reviews*, 135(1-4), pp.115-131.
- Griffith, F., 1928. The significance of Pneumococcal Types. *Journal of Higiene*, 27(2), pp.113-159.
- Hahn, F.E. & Jr, C.L.W., 1955. Mode of action of cloramphenicol III: Action of Chloramphenicol on Bacterial Energy Metabolism.
- Hayes, B.Y.W., 2000. Sexual Differentiation in *Bacterium coli*. *Growth (Lakeland)*, (1953), pp.72-88.
- Heffron, F. & McCarthy., 1979. DNA sequence analysis of the transposon Tn3: Three genes and three sites involved in transposition of Tn3. *Cell*, 18(4), pp.1153-1163.
- Hendrix, R.W., 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5), pp.2192-2197.
- Hobom, B., 1980. Surgery of genes: At the doorstep of synthetic biology. *Genchirurgie: An der schwelle zur synthetischen biologie*, 75(24), pp.14-21.
- Jain, R & Rivera., 1999. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), pp.3801-6.
- Jain, Ravi., 2003. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Molecular biology and evolution*, 20(10), pp.1598-602.
- Joyce G.F., 1996. Building the RNA world. In *Curr. Biol.* 6, pp. 965-967.
- Khalil, T.A. & Gealt, M.A., 1987. Temperature, pH, and cations affect the ability of *Escherichia coli* to mobilize plasmids in L broth and synthetic wastewater. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(8), pp.733-737.

- Kihara, A. & Akiyama., 1997. Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage lambda: transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(11), pp.5544-9.
- Kitamoto, O., N.K., 1956. Drug sensitivity of the Shigella strains isolated in 1955. *Infect. Dis*, 30, pp.403-404.
- Koonin, E.V., 2007. The Biological Big Bang model for the major transitions in evolution. *Biology direct*, 2, p.21.
- Kruger K., Grabowski P.J., Sands J., G.D.E., 1982. Self-splicing RNA. *Nature*, 300(5891), pp.147–157.
- Kunin, V. & He, S., 2008. A bacterial metapopulation adapts locally to phage predation despite global dispersal. *Genome research*, 18(2), pp.293-7.
- Kurland, C.G. & Canback., 2003. Horizontal gene transfer: a critical view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), pp.9658-62.
- Lan, R. & Reeves, P.R., 2006. Gene Transfer is a Major Factor in Bacterial Evolution. *Society*, 13(1), pp.47-55.
- Lederberg, J., 1998. Plasmid (1952-1997). *Plasmid*, 39(1), pp.1-9.
- Lederberg, J. & Tatum, E.L., 1953. Sex in bacteria: Genetic studies, 1945-1952. *Science*, 118(3059), pp.169-175.
- Lercher, M.J. & Pál, C., 2008. Integration of horizontally transferred genes into regulatory interaction networks takes many million years. *Molecular biology and evolution*, 25(3), pp.559-67.
- Lewin., B., 2008. *Genes* Ninth Edit. J. and Bartlett, ed., London UK: Jones and Bartlett.
- Li, W.-H., 1997. *Molecular Evolution*. First edit. U. of Texas, ed., Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Lorenz, M.G. & Aardema., 1988. Highly efficient genetic transformation of Bacillus subtilis attached to sand grains. *Journal of general microbiology*, 134(1), pp.107-12.
- Lorenz, M.G. Wackernagel, W., 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews.*, 58(3), pp.563-602.
- Martínez, J.L. & Baquero, F., 2002. Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity , Epidemicity , and Antibiotic Resistance Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity , Epidemicity , and Antibiotic Resistance †. *Society*, 15(4).

- María Boekels Gogarten, J.P.G., 2009. *Horizontal Gene Transfer: Genomes in Flux*. First. M. B. G. and J. P. Gogarten., ed., New York: Humana Press.
- Mazodier, P. & Davies, J, 1991. Gene transfer between distantly related bacteria. *Annual review of genetics*, 25(27), pp.147-71.
- Morange, M., 2009. The place of systems biology and synthetic biology in the history of biology. *Molecular Biology*.
- Morgante, M. et al., 2005. Gene duplication and exon shuffling by helitron-like transposons generate intraspecies diversity in maize. *Nature genetics*, 37(9), pp.997-1002.
- Ochman, H. & Lawrence., 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), pp.299-304.
- Ptashne, M., 1992. *A genetic switch; phage λ and Higher Organisms*. Second edi. Blackwell, ed., Cambridge Massachusets.
- Rawls, R.L., 2000. "Synthetic biology" makes its debut. *Chemical and Engineering News*, 78(17), pp.49-53.
- Roda, A., 2010. Discovery and development of the green fluorescent protein, GFP: the 2008 Nobel Prize. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(5), pp.1619-22.
- Showsh, S.A. & Andrews Jr., R.E., 1992. Tetracycline enhances Tn916-mediated conjugal transfer. *Plasmid*, 28(3), pp.213-224.
- Soto, L.A.M., 2005. *Uso de Codones, Traducibilidad, Niveles de Expresión y Transferencia Horizontal: ¿Hemos Sobreinterpretado Nuestros Organismos Modelo?* Universidad Nacional Autónoma de México.
- Thomas, C.M. & Nielsen, K.M., 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9), pp.711-21.
- Whitehead, N.A. & Barnard., 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(4), pp.365-404.
- Whittam, TS. Ake, S., 1993. Genetic polymorphisms recombination in natural populations of *Escherichia coli*. *Mechanisms of molecular evolution.*, pp.223-245.

Apéndices.

Apéndice 1.

Preparación de células químicamente competentes.

1. Incubar una alícuota de células, en 2 ml de medio LB líquido 8 horas a 37°C.
 - *La alícuota puede ser un tubo de células DH5α o TOP10 las cuales son cepas de uso corriente en los experimentos de laboratorio.*
2. Con el pre inoculo incubar 100 ml y crecer en agitación vigorosa a 37°C en promedio tres horas hasta alcanzar una densidad óptica de $0.0600\text{nm} = 0.4$
3. Reposar el matraz en agua hielo 10 minutos.
4. Centrifugar 10 minutos a 4°C - 5,000 rpm.
5. Resuspender en 2ml de CaCl_2 (cloruro de calcio) 100Mm / Glicerol 17%.
6. Incubar 4 horas a 37°C en agitación.
7. Alicuotar de 50µl - 100µl en tubos eppendorf, congelar en nitrógeno líquido y guardar a -80°C.
 - *En caso de no contar con nitrógeno líquido, colocar un frasco con 50ml de etanol absoluto a -80°C, el etanol puede congelar las células en un intervalo de tiempo muy corto, aunque puede ser poco práctico es un recurso eficaz.*
8. Para probar la correcta preparación de las células se debe utilizar el protocolo de transformación (se muestra a continuación) insertando un gen reportero, en nuestro caso hemos utilizado un RFP constitutivo, con resultados positivos.

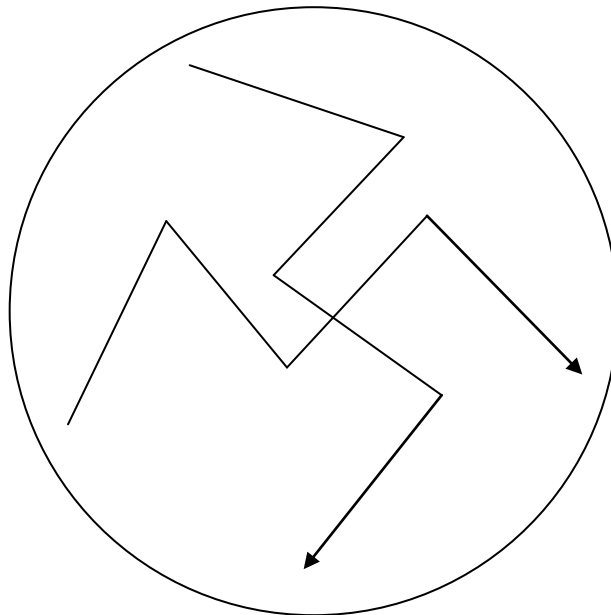
Apéndice 2.

Transformación por choque térmico.

- 1.- En tubos limpios y estériles colocar una alícuota de 3-4 μ l del plásmido a transformar (stock).
- 2.- Dar un *spin* para bajar cualquier gota que se haya adherido a la pared del tubo.
- 3.- Descongelar las células competentes.
 - *El descongelamiento no debe tomar más de 10 minutos; para cada ensayo se utiliza una alícuota, bajo ninguna circunstancia se deben reciclar tubos una vez descongelados pierden sus propiedades transformantes.*
- 4.- Tomar con una pipeta el contenido total del tubo de células competentes y transferirlo al tubo que contiene el plásmido, mezclar muy suave.
 - *Tomar en cuenta que las células se encuentran muy maltratadas ya que pasan por un proceso de estrés térmico por lo que este paso debe ser con mucho cuidado.*
- 5.- Incubar en hielo 20 min.
 - *Prender el baño María y estabilizar en 42°C.*
- 6.- Someter a choque térmico en el baño María 50 segundos.
 - *Cuidar que al momento de que los tubos se sumergen en el baño María el agua sólo toque la punta sin que llegue a la tapa evitando el riesgo de que el agua se pueda filtrar contaminando el contenido.*
- 7.- Inmediatamente regresar los tubos al hielo y esperar 2 min (choque térmico).
- 9.- Agregar 300 μ l de medio LB estéril y pipetear muy suave.
 - *Este paso también se conoce como recuperación de células.*
- 10.- Incubar a 37°C con agitación vigorosa a 150 rpm 90 minutos.
 - *Sacar las cajas de refrigeración para que tomen temperatura ambiente.*
- 11.- Tomar 200 μ l con pipeta y sembrar en cajas petri.

- *Las cajas de siembra deben haber sido preparadas con las dosis correctas de antibiótico, el agar debe mostrar una consistencia firme, es común que si las cajas tienen mucho tiempo en refrigeración pierdan consistencia por lo que se deben revisar antes de comenzar el experimento.*

12.- Utilizar una haza de siembra distribuir de forma homogénea como se muestra en la siguiente figura.



Apéndice 3.

MIDIPREP

1. Dejar un inóculo de 12 horas (*overnight*) en tubos falcon de 50 ml se recomienda que un inóculo de de 30 a 35 ml de medio, esto permitirá una correcta oxigenación y un crecimiento óptimo.
2. Centrifugar veinte minutos a 4,000 rpm, tirar el sobrenadante y dejar aproximadamente 1ml de medio en tubo para disolver en vortex.
 - *Previo a centrifugar es necesario nivelar el peso, utilizando una balanza, se pesan ambos tubos, el que tenga mayor peso es el de referencia, el de menor peso se nivela utilizando agua ddH₂O también conocida como agua miliQ.*
3. Agregar 3 ml de solución Birboim I (agregarle 5ml/ml) para disolver en el vortex , pasar la mezcla a tubos de 15 ml y dejar 10 min en temperatura ambiente.
4. Agregar 3ml de solución Birboim II mezclar por inversion 6 veces, incubar en hielo 10 min.
5. Agregar 3ml de solución Birboim III mezclar por inversion 6 veces, incubar en hielo 10 min.
6. Centrifugar a 4,000 rpm 20 minutos.
 - *Es muy importante en este paso cuidar que los desechos celulares se encuentren bien precipitados y firmes en el fondo del tubo, ya que en él se encuentran proteinasas, DNAsas que pueden dañar el plásmido.*
7. Transferir sobrenadante a un tubo flacon nuevo y estéril de 15 ml.
 - *De ser necesario repetir el paso número 5 y precipitar nuevamente los desechos celulares ya que con frecuencia estos no quedan bien asentados en el fondo con un riesgo potencial de perder DNA.*

- *Si el volumen del sobrenadante es mayor al 7 ml dispensar en otro tubo, nunca pasar de un volumen de 7ml.*
8. Agregar un volumen de 1:1 de Isopropanol e incubar 1 hora a -20°C.
 9. Centrifugar 30 minutos a 4,000 rpm y decantar dejando un aproximadamente 500 µl para despegar la pastilla y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 ml
 10. Lavar la pastilla con 500µl de etanol al 70% y centrifugar a 15,000rpm durante 10 minutos.
 11. Decantar y secar la pastilla en vacio 15 minutos a 45 °C
 12. Agregar 200 µl de agua inyectable y dejar reposar 30 minutos a 40°C
 - *En este paso se recomienda observar la densidad de la pastilla los 200 µl pueden incrementarse a 400 incluso 700 si la pastilla es muy visible.*
 - *Para obtener un buen resultado al momento de despegar la pastilla se recomienda precalentar una alícuota de ddH₂O en termoblock a 65 °C 10 minutos.*
 13. Resuspender la pastilla utilizando una pipeta de 1ml.
 14. Dependiendo del volumen en que hayamos resuspendido, se recomienda utilizar de 2 a 3µl de RNAsa e incubar a 37°C 30 minutos.
 - *En caso de no terminar los tubos se pueden guardar a -20°C al día siguiente descongelar y agragar la RNAsa.*

Apendice 4.

A continuación se detallan las proporciones que se fueron utilizadas para realizar digestiones y el tiempo de incubación, en todos los casos la temperatura fue a 37°C y el tiempo de incubación de tres horas.

Digestión con Xbal

| | |
|-------------------------|--------|
| DNA plasmidico_____ | 95µl |
| Enzima Xbal_____ | 9µl |
| Buffer Tango_____ | 11µl |
| DdH ₂ O_____ | 15µl |
| Total | 130 µl |

Digestión con Spel

| | |
|-------------------------|--------|
| DNA plasmidico_____ | 95µl |
| Enzima Spel_____ | 9µl |
| Buffer Tango_____ | 11µl |
| DdH ₂ O_____ | 15µl |
| Total | 130 µl |

Digestión con PstI

| | |
|-------------------------|--------|
| DNA plasmidico_____ | 95µl |
| Enzima Xbal_____ | 9µl |
| Buffer O_____ | 11µl |
| DdH ₂ O_____ | 15µl |
| Total | 130 µl |

Digestión con EcoRI

| | |
|-------------------------|--------|
| DNA plasmidico_____ | 60µl |
| Enzima EcoRI_____ | 6µl |
| Buffer Q10X_____ | 9µl |
| DdH ₂ O_____ | 25µl |
| Total | 100 µl |

Apéndice 5.

Ligación.

1. Se tomó una lectura en el nanodrop, el blanco que se utilizó fue agua ddH₂O MiliQ:

| | |
|---------|------------------|
| Inserto | 9.4 ng/μl |
| Vector | 10.5ng/μl |

2. Se realizaron los siguientes cálculos para obtener el volumen en ng/μl que recomienda la hoja técnica del proveedor, como se detalla a continuación:

- Concentración del Inserto = 9.4 ng/μl
- Tamaño del inserto en pares de bases = 1,963 pb
- Tamaño del vector en pares de bases = 2,206 pb
- Proporción que deseo = 1:5 (uno de vector 5 de inserto)

$$\text{Inserto } \frac{(9.4 \text{ ng}/\mu\text{l}) (1,963 \text{ pb})}{(2,206 \text{ pb}) (5)} = \frac{18452.20}{11030} = 1.67 \text{ ng}/\mu\text{l de vector}$$

- Hacemos el cálculo para diluir el vector a 1.67 ng/μl

| | |
|---------------------------|-------------------------|
| Lo tengo | Lo quiero |
| └──────────┘ └──────────┘ | |
| [10.5 ng/μl] | [?] = [1.67ng/μl] [10μ] |

$$= 1.59 \mu\text{l de vector diluido en } 10\mu\text{l}$$

-
- Aforamos 1.59μl de vector en 10 μl de ddH₂O para dejarlo en una concentración final de 1.67 ng/μl, para el mix de ligación tomo 1μl de vector y 1μl de inserto (sin diluir = 1.67 μl)
- 1.67 ng/μl * 5 = 8.35ng/μl ≈ 9.4 ng/μl (1.67 ng/μl multiplicado por 5 es igual a 8.35 ng/μl esto es muy parecido a 9.4ng/μl que es la concentración del inserto sin diluir guardando una proporción 1:5 vector – inserto)

Mix de ligación:

| | |
|--------------------------|------------|
| Vector de DNA_____ | 1 μ l |
| Inserto_____ | 1 μ l |
| 10XT4 Ligasa Buffer_____ | 1 μ l |
| T4 DNA Ligasa_____ | 1 μ l |
| DdH ₂ O_____ | 5 μ l |
| Total | 10 μ l |

3. Hacer el mix un tubo de PCR y poner en termociclador con el siguiente programa:
 - 1 hora a 22°C
 - 20 minutos a 60°C (para desactivar la reacción).
 - Terminar la reacción y almacenar a 4°C.
4. Transformar la ligación inmediatamente.

Apéndice 6.

Extracción de DNA a partir de gel de agarosa (purificación de banda).

1. Una vez que hemos terminado la electroforesis y ubicamos la banda de interés en el transiluminador, procedemos a cortar con una navaja de bisturí, si no tenemos una a la mano puede funcionar una navaja de rasurar en cualquier caso debe ser un instrumento limpio y pasado por alcohol; en este paso se recomienda utilizar doble guante de nitrilo ya que estamos manipulando el gel con residuos de bromuro de etidio. Con mucho cuidado separamos el fragmento de agarosa que contiene el DNA y lo pasamos a un tubo eppendorf de 1.5ml, este paso debe ser realizado con rapidez ya que en el proceso estamos exponiendo el DNA a rayos UV lo que puede dañar el material genético.
2. *Taramos* el tubo eppendorf para tener únicamente el peso del fragmento de agarosa, agregamos un volumen 1:1 de *Binding Buffer* por ejemplo si el fragmento de agarosa tiene un peso de 100mg se adicionan 100 μ l de Buffer.
3. Incubamos el tubo en el *termoblock* a una temperatura entre 50 y 60°C por 10 minutos, en este lapso de tiempo el gel debe disolverse perfectamente y adoptar un color amarillo pálido, esto indica que el PH es el óptimo si el color es anaranjado o violeta quiere decir que el PH es muy básico para corregir esta situación se debe adicionar 10 μ l de 3M de acetato de sodio PH 5.2 y homogenizar cuidadosamente hasta obtener la mezcla en tono amarillo.
4. El paso que se menciona a continuación es opcional y sólo debe aplicarse cuando tenemos fragmentos ≤ 500 bp o ≥ 10 kilobases
 - Si el fragmento es ≤ 500 bp adicionar 1:2 volúmenes de isopropanol por ejemplo si tenemos 100mg de gel disueltos en 100 μ l de *Binding Buffer* adicionar 100 μ l de isopropanol al tubo y mezclar vigorosamente.
 - Si el fragmento es ≥ 10 kilobases adicionar 1:2 volúmenes de agua por ejemplo 100mg de gel disueltos en 100 μ l de *Binding Buffer* adicionar 100 μ l de agua y mezclar vigorosamente.

5. Transferir el contenido de la solución del paso 3 a una columna de purificación y centrifugar por un minuto, descartar los residuos del tubo colector.
6. Adicionar 700 μ l del *Buffer* de lavado, y centrifugar por un minuto, desechar los residuos nuevamente del tubo colector y repetir el mismo paso.
7. En este paso se debe transferir la columna con la membrana a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril, y eluir con 50 μ l del Buffer de elusión o en su defecto ddH₂O, cualquiera que sea el líquido que se seleccione para eluir es necesario **precalentar a 65°C por 10 minutos, dejar caer en el centro de la membrana los 50 μ l y reposar 6 minutos**. Finalmente centrifugar 2 minutos a velocidad máxima.

Apéndice 7.

Prueba de Wilcoxon para los valores del control y el tratamiento de dos resistencias y dos antibióticos (replica 1).

Wilcoxon Signed Rank Test

Data source: Data 1 in Notebook2

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.186)

Test execution ended by user request, Paired t-test begun

Paired t-test:

Data source: Data 1 in Notebook2

| Treatment Name | N | Missing | Mean | Std Dev | SEM |
|----------------|----|---------|-------|---------|--------|
| Col 1 | 14 | 0 | 1.381 | 0.000 | 0.000 |
| Col 2 | 14 | 0 | 0.357 | 0.291 | 0.0779 |
| Difference | 14 | 0 | 1.024 | 0.291 | 0.0779 |

t = 13.151 with 13 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: 0.856 to 1.193

Two-tailed P-value = 0.00000000691

The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change (P = <0.001)

One-tailed P-value = 0.00000000346

The sample mean of treatment Col 1 exceeds the sample mean of treatment Col 2 by an amount that is greater than would be expected by chance, rejecting the hypothesis that the population mean of treatment Col 2 is greater than or equal to the population mean of treatment Col 1. (P = <0.001)

Power of performed two-tailed test with alpha = 0.050: 1.000

Power of performed one-tailed test with alpha = 0.050: 1.000

Prueba de Wilcoxon para los valores del control y el tratamiento de dos resistencias y dos antibióticos (replica 2).

Wilcoxon Signed Rank Test

Data source: Data 1 in Notebook2

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.470)

Test execution ended by user request, Paired t-test begun

Paired t-test:

Data source: Data 1 in Notebook2

| Treatment Name | N | Missing | Mean | Std Dev | SEM |
|----------------|----|---------|-------|---------|--------|
| Col 3 | 14 | 0 | 1.381 | 0.000 | 0.000 |
| Col 4 | 14 | 0 | 0.427 | 0.166 | 0.0442 |
| Difference | 14 | 0 | 0.954 | 0.166 | 0.0442 |

t = 21.553 with 13 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: 0.858 to 1.049

Two-tailed P-value = 1.476E-011

The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change (P = <0.001)

One-tailed P-value = 7.378E-012

The sample mean of treatment Col 3 exceeds the sample mean of treatment Col 4 by an amount that is greater than would be expected by chance, rejecting the hypothesis that the population mean of treatment Col 4 is greater than or equal to the population mean of treatment Col 3. (P = <0.001)

Power of performed two-tailed test with alpha = 0.050: 1.000

Power of performed one-tailed test with alpha = 0.050: 1.000

Apéndice 8

Código en MATHEMATICA donde se puede simular el comportamiento de $F(x)$.

```
Manipulate[GraphicsRow[{Plot3D[1/(2Pi * sigmax * sigmay * Sqrt[1 - rho^2])
  * Exp[-1/(2 * (1 - rho^2)) * ((x - mux)^2/sigmax^2 + (y - muy)^2/sigmay^2 - 2
  * rho * (x - mux) * (y - muy)/(sigmax * sigmay))],{x, 18,22},{y, 23,27},PlotRange
  -> {0, 1/(2Pi * sigmax * sigmay * Sqrt[1 - rho^2])},ViewPoint -> {5, -5,2},AxesLabel
  -> {x, y, None},Boxed -> False,AxesEdge -> Automatic,ImageSize
  -> {275,275},DensityPlot[1/(2Pi * sigmax * sigmay * Sqrt[1 - rho^2])
  * Exp[-1/(2 * (1 - rho^2)) * ((x - mux)^2/sigmax^2 + (y - muy)^2/sigmay^2 - 2
  * rho * (x - mux) * (y - muy)/(sigmax * sigmay))],{x, 18,22},{y, 23,27},FrameLabel
  -> {x, y},ImageSize -> {275,275}],{{mux, 20,  $\mu_x$ },18,22, Appearance
  -> "Labeled"},{{muy, 25,  $\mu_y$ },23,27, Appearance
  -> "Labeled"},{{sigmax, 1,  $\sigma_x$ },.5, 2, Appearance
  -> "Labeled"},{{sigmay, 1,  $\sigma_y$ },.5, 2, Appearance
  -> "Labeled"},{{rho, 0, " $\rho$ "}, -.95,.95, Appearance -> "Labeled"}]
```