



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR Y BÚSQUEDA DE  
ZONAS DE INESTABILIDAD POR SITIOS DE RESTRICCIÓN  
EN TRES PLÁSMIDOS R**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**CLARA ELISA CASTAÑOS SÁNCHEZ DE LA  
BARQUERA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA**

**2014**

**Ciudad Universitaria, D. F.**



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.

1.Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Facultad Carrera No. de cuenta	1.Datos del alumno Castaños Sánchez de la Barquera Clara Elisa 57483080 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 308021563
2.Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	2. Datos del tutor Dr. Rafael Camacho Carranza
3.Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	3.Datos del sinodal 1 Dr. Víctor Manuel Valdés López
4.Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	4.Datos del sinodal 2 Dr. Jesús Ramírez Santos
5.Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	5.Datos del sinodal 3 M. en C. Alfonso José Vílchis Peluyera
6.Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	6.Datos del sinodal 4 Quím. Viviana Escobar Sánchez
7.Datos del trabajo escrito Título  Número de páginas Año	7.Datos del trabajo escrito Determinación del peso molecular y búsqueda de zonas de inestabilidad por sitios de restricción en tres plásmidos R. 73 2004

## **Agradecimientos**

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la tutoría del Dr. Rafael Camacho Carranza y con el apoyo otorgado por el proyecto PAPIIT IN207513.

Agradezco a mi madre por sus consejos, por su apoyo y por brindarme todo lo necesario para una buena educación.

Agradezco al Dr. Rafael Camacho Carranza por proporcionarme un lugar en su equipo de trabajo, por el apoyo, el conocimiento y los consejos proporcionados durante mi estancia en el equipo y la realización de mi trabajo.

Agradezco también a la Biol. Sandra Luz Hernández Ojeda por su apoyo en la realización de la electroforesis en campos pulsados.

Y agradezco a mis compañeros de laboratorio, a mi novio, amigos, familiares y profesores que de alguna manera me acompañaron y apoyaron en la realización de este proyecto.

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1. Dinámica de los genomas bacterianos.....	6
2. Plásmidos.....	6
2.1 <i>Transferencia horizontal</i> .....	7
2.2 <i>Incompatibilidad plasmídica</i> .....	8
2.3 <i>Resistencia a antibióticos mediada por plásmidos</i> .....	8
2.4 <i>Estudio de plásmidos por electroforesis en gel agarosa</i> .....	9
3. Estabilidad plasmídica .....	11
3.1 <i>Integridad plasmídica</i> .....	12
3.2 <i>Sistemas de estabilización de plásmidos</i> .....	13
4. Características de <i>Salmonella typhi</i> .....	16
5. <i>Antecedentes</i> .....	17
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>22</b>
<b>V. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
Objetivo general.....	22
Objetivos particulares.....	23
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODO.....</b>	<b>23</b>
1. Cultivo de cepas .....	24
2. Desarrollo del método de Eckhardt.....	25
3. Marcadores de peso molecular para el método de Eckhardt.....	26
3.1 <i>Preparación de DNA bacteriano embebido en agarosa</i> .....	27
3.2 <i>Digestión del DNA bacteriano embebido en agarosa con enzimas de restricción</i>	27
4. Obtención de plásmidos recombinantes derivados.....	29
4.1 <i>Cálculo de generaciones bacterianas</i> .....	30
5. Extracción de plásmidos por lisis alcalina con SDS: Minipreparación.....	30
6. Electroforesis de los plásmidos extraídos por lisis alcalina.....	32
6.1 <i>Electroforesis convencional</i> .....	32
6.2 <i>Electroforesis en campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)</i> .....	32
7. Preparación de Ribonucleasa A.....	33

8. Enzimas de restricción.....	34
9. Análisis de resultados en Excel.....	35
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>37</b>
Estandarización de la electroforesis tipo Eckhardt.....	37
Extracción plasmídica mediante lisis alcalina.....	39
Plásmidos recombinantes derivados.....	39
Determinación del peso molecular mediante electroforesis en campos pulsados (PFGE) y patrones de restricción para el plásmido pHN32.....	42
Cortes del plásmido pCOM69 con enzimas de restricción.....	46
Cortes del plásmido pFEC59 con enzimas de restricción.....	52
Esquemas concluyentes.....	57
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>62</b>
<b>X. REFERENCIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>XI. ANEXOS.....</b>	<b>70</b>

## I. RESUMEN

Mediante diversos estudios se ha demostrado que *S. typhi* (*Salmonella typhi*) es capaz de adquirir factores R, incluso provenientes de *E. coli* (*Escherichia coli*); sin embargo se ha observado que la mayoría de los plásmidos adquiridos por cepas de *S. typhi* cuando se suspende la presión de selección, se pierden; recientemente se demostró que esta pérdida va acompañada de eventos recombinogénicos

Encaminados a entender con mayor profundidad los mecanismos presentes en bacterias con un dinámico genoma como lo es el de *Salmonella*, se propone que el fenómeno de recombinación diferencial observado entre *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* a nivel de plásmidos R, será una herramienta útil para el estudio de rearrreglos genómicos y brindará material para abordar el problema de la adquisición de resistencia a antibióticos en bacterias.

Para comenzar a abordar el problema, en este estudio se logró determinar el tamaño de tres plásmidos R, pFEC59, pCOM69 y pHN32 estables en *E. coli* pero inestables en *S. typhi* mediante el uso de diferentes técnicas de electroforesis y perfiles de restricción. Así mismo mediante la selección diferencial con antibióticos se aislaron plásmidos recombinantes derivados de los tres plásmidos anteriores.

Por último, también fue posible estimar el peso molecular de algunas de las regiones que pudiesen estar siendo eliminadas en algunos de estos recombinantes derivados.

## II. INTRODUCCIÓN.

### 1. Dinámica de los genomas bacterianos

En los últimos años la comparación de genomas entre diferentes especies y dentro de individuos de la misma especie, ha permitido, entre otras cosas, la identificación de zonas de variabilidad en los genomas, observando las modificaciones en el orden y la composición de los elementos genéticos (Mira *et al.*, 2002; Abby y Daubin 2007); de tal modo que se han podido identificar elementos móviles como islas genómicas, secuencias de inserción y genes sujetos a transferencia horizontal (Ochman *et al.*, 2000), con lo que se confirma que la recombinación no homóloga y la transferencia horizontal de genes son eventos generalizados en procariontes (García Vallve *et al.*, 2000; Gogarten *et al.* 2002; Koonin y Wolf 2008).

A partir de este tipo de estudios se sabe que los genomas bacterianos en general, son dinámicos y se puede considerar que hay gran diversidad en ellos, lo cual es observable en las diferencias de la estructura genómica, que es generada por rearrreglos, inversiones o translocaciones (Tillier *et al.* 2000; Darling *et al.* 2004; Sun *et al.*, 2012). Esta diversidad también conlleva a la presencia de diferencias en el repertorio genético entre los individuos, como la escisión génica o la recombinación desigual (Haack *et al.*, 1995), la recombinación no homóloga o ilegítima, la transferencia horizontal (Ochman *et al.*, 2000; Spratt *et al.*, 2001; Fraser 2009, Dutta C 2002) y mecanismos de duplicación génica con lo que se adquieren genes parálogos.

Mucho se ha especulado sobre la forma en que los procesos antes mencionados dan pie a la generación y mantenimiento de la diversidad de especies (Mira *et al.*, 2002). En procariontes, los descubrimientos de la genómica comparada, el paradigma clonal de diversidad bacteriana y las ideas de que las islas genómicas (Juhás *et al.*, 2009) adquiridas por transferencia horizontal son factores que juegan un papel importante en la adecuación a ambientes particulares y que confieren nuevas capacidades metabólicas al individuo (Treangen y Rocha 2011), han conducido al estudio de este



fenómeno no sólo como una parte importante en el proceso de evolución del genoma, sino también como un mecanismo de adaptación bacteriana (Dutta 2002).

La transferencia horizontal se ha llegado a considerar como un mecanismo importante causante de la evolución y adaptación bacteriana (Ochman y Moran 2001; Hacker y Kaper, 2000; Lawrence y Ochman 1998; Lawrence 2001, Juhas, et al. 2009). Un ejemplo muy claro de esto es el evento de especiación/divergencia entre *E. coli* y *Salmonella*, donde se ha considerado que la obtención del operón *lac* por *E. coli* es un evento de transferencia horizontal que le ha conferido el desarrollo de las propiedades metabólicas necesarias para la expansión de una especie a un nuevo nicho (Ochman *et al.*, 2000).

## **2. Plásmidos**

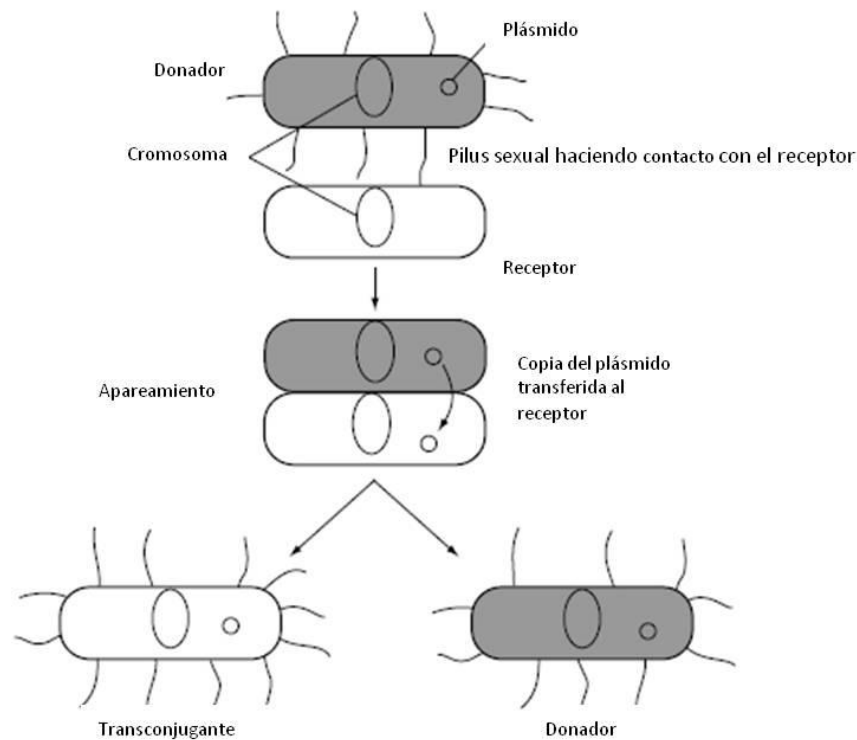
Los plásmidos son elementos circulares de DNA extracromosómico que se replican autónomamente en las células portadoras de ellos. Se encuentran presentes en prácticamente todas las especies de bacterias y su tamaño puede ser muy variable, desde 2 kb (kilobases) hasta cientos de kb (Waters 1999).

Los plásmidos contienen genes para la iniciación y control de la replicación, así como genes que pueden ser útiles a la bacteria, como de resistencia antimicrobiana (a los cuales se les denominan plásmidos R o factores R) o de virulencia (Amabile Cuevas y Chicurel, 1992; Bergstrom *et al.*, 2000)

### ***2.1 Transferencia horizontal***

Se ha visto que los plásmidos pueden aumentar la diversidad genética bacteriana, con la adquisición y pérdida de genes que pueden ser transferidos horizontalmente entre las poblaciones bacterianas mediante conjugación o movilización (Francia *et al.*, 2004).

La conjugación bacteriana es un mecanismo de transferencia horizontal de genes, en el cual existen contactos directos entre ambas células, con intervención de estructuras superficiales especializadas y de funciones específicas (pili sexuales en los Gram negativos, y contacto íntimo en los Gram positivos). La bacteria donadora posee el factor de fertilidad (factor F), será la bacteria F<sup>+</sup> y la receptora se denomina F<sup>-</sup> (Falkow 1975). El DNA que se transfiere se replica en forma autónoma en la bacteria receptora que se denominará ahora transconjugante. (Novick *et. al.*, 1976)(fig. 1).



**Fig. 1.** Esquema de la transferencia de DNA por conjugación (tomada y modificada de Dale *et al.*, 2004).

Algunos plásmidos pueden integrarse al cromosoma bacteriano y replicarse como parte del cromosoma huésped, mientras que otros permanecen separados del genoma y se replican autónomamente, en tal caso se les denomina episomas (Novick *et al.*, 1976). Cuando el plásmido F se integra al cromosoma, es capaz de inducir la transferencia del genoma total de la célula a la receptora. Estas cepas se denomina Hfr

(High frequency of recombination) porque presentan una alta frecuencia de recombinación (Falkow 1975).

## **2.2 Incompatibilidad plasmídica**

Una manera de clasificar a los plásmidos es a través de los grupos de incompatibilidad (Inc) (Novick 1987). Esta manera se basa en la introducción por conjugación o transformación de un plásmido perteneciente a un grupo Inc desconocido a una cepa que contiene un plásmido de grupo Inc conocido. Si el plásmido original es eliminado en la descendencia, el plásmido introducido se asigna a su mismo grupo Inc (Datta y Hedges 1971).

Los plásmidos que tienen los mismos requerimientos genéticos en el control de replicación son incompatibles entre sí, de tal modo que plásmidos con diferentes controles de replicación son compatibles. Con base en lo anterior, dos plásmidos pertenecientes al mismo grupo Inc no se pueden propagar en la misma cepa bacteriana (Datta y Hughes 1983; Couturier *et al.*, 1988). Este método de clasificación ha sido una útil herramienta para estudiar la difusión de plásmidos R y seguir la evolución y propagación de plásmidos emergentes (Anderson *et al.*, 1977).

## **2.3 Resistencia a antibióticos mediada por plásmidos**

Aunque la resistencia a los antibióticos es una expresión natural de la evolución y genética bacteriana, ciertos factores también contribuyen al aumento de la expresión y diseminación de esta característica inherente. El incremento en el uso de antibióticos y la respectiva presión selectiva que ejercen, es el factor más importante que contribuye a la aparición de diversas clases de resistencia bacteriana (Ang *et al.*, 2004).

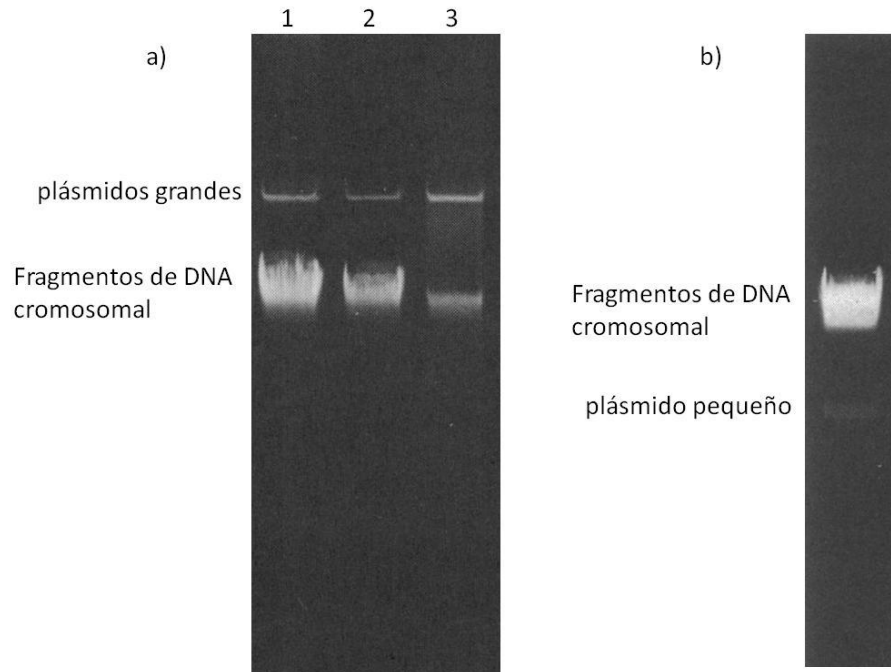
Un ejemplo que ofrece muestras evolutivas de resistencia, es la bacteria *Staphylococcus aureus*, que en 1946 presentaba la mayoría de sus cepas sensibles a la penicilina; en la actualidad casi todas las cepas hospitalarias, son resistentes a

bencilpenicilina y algunas lo son a meticilina, gentamicina o a ambas y sólo se pueden tratar con vancomicina (Prescott *et. al.*, 2004). Además, en los últimos 25 años han seleccionado microorganismos resistentes a múltiples fármacos, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*, que, al aumentar causan infecciones en ambientes nosocomiales; es por ello que la resistencia a los fármacos constituye un problema grave de salud pública (Prescott *et. al.*, 2004; French 2005).

La resistencia puede ser una propiedad natural de un organismo (intrínseca) o conseguida por mutación o adquisición de plásmidos o transposones, los genes de resistencia naturales en plásmidos, se originan como mutaciones puntuales en los genes blanco (sitios de inserción de los genes de resistencia) de bacterias susceptibles y también de genes que les proveen protección contra otras bacterias (Frost *et. al.*, 2005).

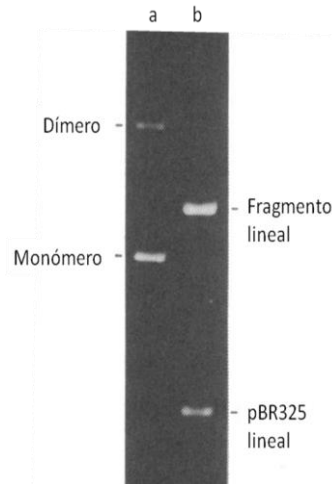
#### ***2.4 Estudio de plásmidos por electroforesis en gel de agarosa***

Independientemente de la técnica que se lleve a cabo para la extracción física de plásmidos, un método común para evidenciar dicha extracción es a partir de la detección del DNA plasmídico mediante una electroforesis en gel de agarosa. Dado que el DNA cromosómico se fragmenta en el proceso de extracción en el gel aparecen restos como una banda difusa y el DNA del plásmido aparece en bandas distintas, determinadas por su tamaño. Los plásmidos pequeños migran a mayor velocidad dentro del gel, por lo que se observan por debajo del DNA cromosomal y los plásmidos grandes quedan por arriba de éste (fig. 2) (Dale *et. al.*, 2004).



**Fig. 2.** Distribución de moléculas de plásmidos de *E. coli* según su tamaño después de un corrimiento electroforético. a) plásmidos grandes b) plásmido pequeño (tomada y modificada de Kado et. al., 1981).

En cuanto a su conformación espacial, los plásmidos con mayor grado de enrollamiento migran más rápido, de tal manera que por lo general los de forma superenrollada son los que migran más rápido, los de forma circular migran más lento que los anteriores y los lineales son los más lentos aunque el peso molecular de los tres sea el mismo. Por último, adicional a estos dos factores también pueden encontrarse dímeros y multímeros que presentan una movilidad más lenta (fig. 3) (Dale et al., 2004).

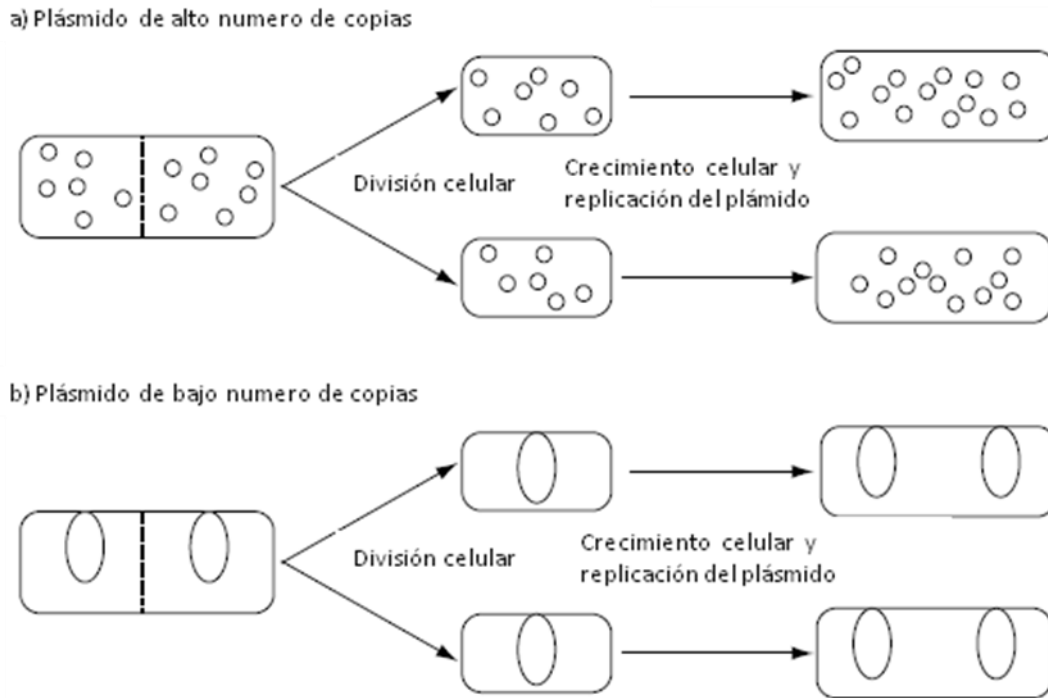


**Fig. 3.** Electroforesis del plásmido pTL2015 antes y después de la digestión con la endonucleasa Sall. (a) Molécula circular covalente cerrada de pTL2015 como dímeros y monómeros (b) fragmento clonado del plásmido pTi1422 y su vector de clonación pBR325 en forma lineal después de ser tratado con Sall. (tomada y modificada de Kado et. al., 1981).

### 3. Estabilidad plasmídica

La estabilidad es una característica importante en los plásmidos. Plásmidos naturales comúnmente son más estables que aquellos construidos de manera artificial (Dale et. al., 2004).

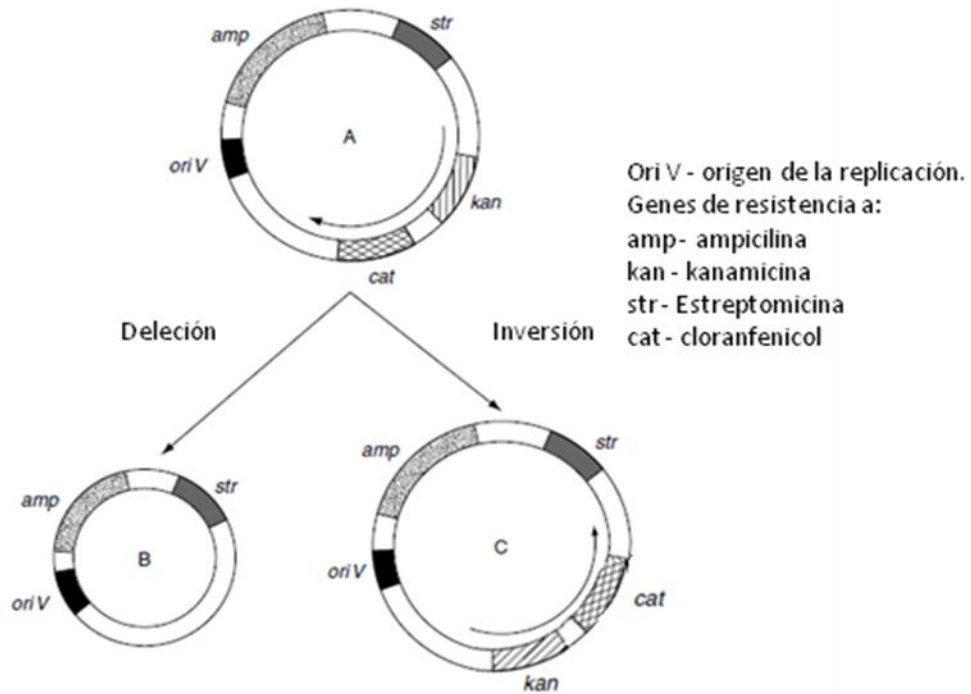
En general los plásmidos grandes se encuentran en un bajo número de copias dentro de la célula, ya que de lo contrario la carga metabólica para mantener y duplicar sus genomas sería excesiva; pero con un bajo número de copias la distribución aleatoria de las copias del plásmido durante la división celular pone en peligro que el plásmido sea copiado fielmente a las células hijas (fig. 5).



**Fig. 5.** Esquema que ejemplifica la replicación de plásmidos (tomada y modificada de Dale *et al.*, 2004).

### 3.1 Integridad plasmídica

Los plásmidos pueden volverse inestables por presentar una tendencia a perder genes debido a la presencia de puntos calientes de recombinación. Plásmidos inestables suelen presentar *deleciones* o *inversiones* (fig. 4) y secuencias repetidas causadas por transposones o secuencias de inserción (Dale *et al.*, 2004).



**Fig. 4.** Inestabilidad plasmídica. Ejemplos de cómo puede cambiar la estructura de un plásmido: una *delección* de los genes cat y kan en el plásmido B y una *inversión* entre los genes cat y kan en el plásmido C (tomada y modificada de Dale *et. al.*, 2004).

### 3.2 Sistemas de estabilización de plásmidos

Se han descrito tres principales mecanismos estabilizadores de plásmidos:

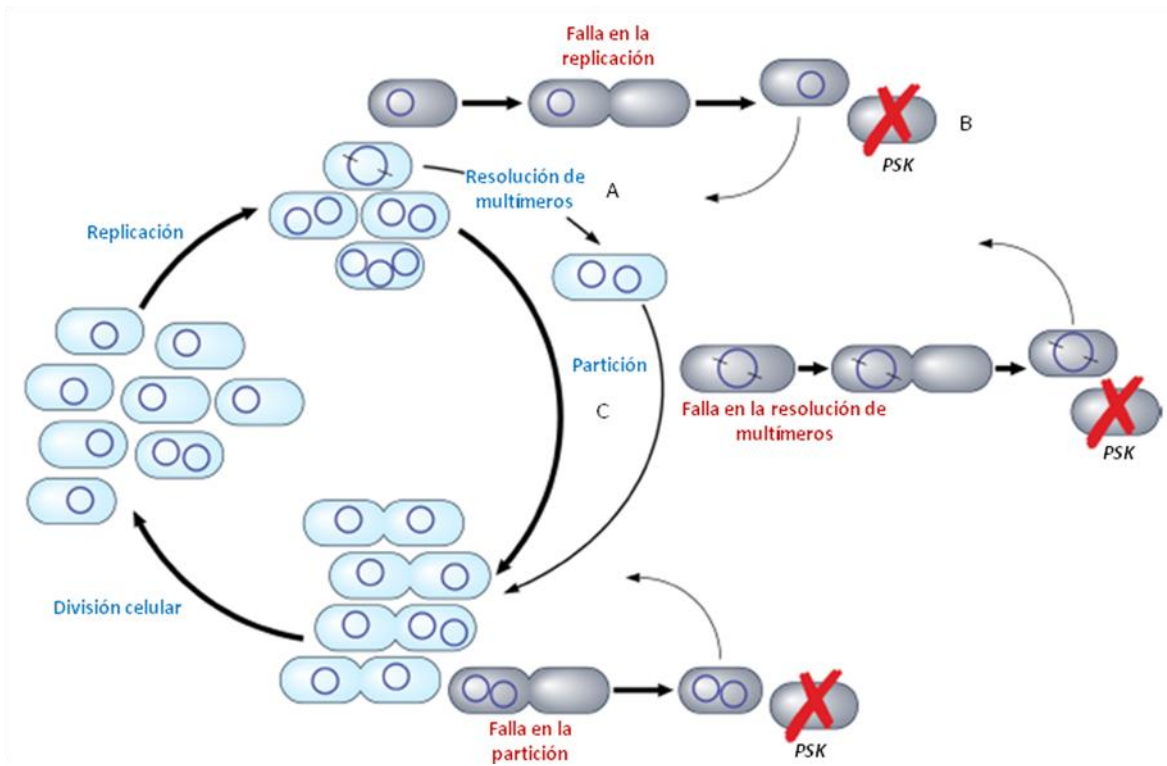
- 1) Sistemas de Resolución de Multímeros: estos sistemas resuelven el número de multímeros plasmídicos causados por la replicación y recombinación entre los plásmidos hermanos, maximizando así el número de copias de plásmidos disponibles para la segregación (fig. 6 A).

Esto se lleva a cabo por un sistema de recombinación sitio específico mediado por enzimas, los plásmidos grandes codifican su propia recombinasa que actúa sobre un sitio de recombinación específico, por ejemplo, se han descrito dos familias de recombinasas presentes en diferentes tipos de plásmidos: la recombinasa sitio- activo tirosina y la recombinasa sitio activo serina. Los dímeros contienen dos de estos sitios de específicos de recombinación que son



cortados y reunidos por las proteínas para formar dos monómeros circulares separados. (Sengupta y Austin 2011)

- 2) Sistemas de Muerte Postsegregacional: la muerte postsegregacional o PSK (Postsegregational Killing) elimina las células que perdieron el plásmido, para asegurar la presencia de este en la población (fig. 6 B). En los sistemas PSK tipo II, el plásmido tiene un gen que codifica para una toxina antibacteriana que puede matar o detener el crecimiento de la célula, y un producto de corta duración que actúa como un antídoto a la toxina. Cuando el plásmido está presente en la celular la antitoxina inactiva la toxina, pero cuando el plásmido es perdido, la antitoxina se degrada rápidamente y la toxina mata a la célula (Hayes, F. 2003). También existen los sistemas denominados PSK tipo I donde un RNA antisentido del plásmido bloquea la función del mRNA que codifica para la toxina. Si el plásmido se pierde, el RNA antisentido se degrada rápidamente y la traducción del mRNA es más estable, con lo que se produce más toxina. (Gerdes, K. y Wagner E. G., 2007; Sengupta y Austin 2011)
  
- 3) Sistemas de partición: estos sistemas segregan activamente los plásmidos hermanos a las células hijas, dirigiendo la segregación activa de los plásmidos a cada lado del centro de la célula antes de la división, minimizando así las posibilidades de pérdida de plásmido (fig. 6 C). Estos sistemas se componen de una proteína motora, ya sea una ATPasa o una GTPasa, una proteína adaptadora que se une al DNA en un sitio específico y el sitio en el que actúan, el cual funciona como un centrómero. (Gerdes *et. al.*, 2000). En estudio reciente, llevado a cabo por Hayashi *et. al.* (2014), se encontró una región de DNA necesaria para mantener la estabilidad de los plásmidos de la bacteria *Sphingobium yanoikuyae*, esta región se localizó en el plásmido Pyan-1 de la bacteria y se observó que este fragmento de DNA está asociado a los mecanismos de partición del plásmido.



**Fig. 6.** Combinación de los sistemas de mantenimiento de plásmidos para lograr una herencia estable. Se observa el ciclo celular en las células color azul claro. La replicación del plásmido duplica el número de plásmidos en cada célula y algunos plásmidos forman dímeros por recombinación, los dímeros se reducen a monómeros por el sistema de resolución de multímeros. Los plásmidos replicados son sometidos a partición activa en mitades opuestas de la célula, asegurando que la división celular produzca dos células, cada una de las cuales contiene al menos una copia del plásmido. Las células grises representan células donde la replicación, la resolución de multímeros o el sistema de partición del plásmido han fallado. En cada caso, se producen células que no contienen al plásmidos y el sistema PSK elimina estas células (tomada y modificada de Sengupta y Austin 2011).

Se ha propuesto que los plásmidos grandes de virulencia y de bajo número de copias codifican al menos uno de los tres tipos de sistema de mantenimiento de plásmidos, para mantener la estabilidad dentro de la población (Sengupta y Austin 2011).

## 1. Características de *Salmonella typhi*

*Salmonella typhi* no se trata estrictamente de una especie, se ha clasificado como un serotipo dentro de una subespecie (*Salmonella enterica serovar typhi*) (Brenner *et al.*, 2000). Es una enterobacteria gram-negativa, móvil, aerobia facultativa y es un patógeno causante de la fiebre tifoidea. Bioquímicamente produce H<sub>2</sub>S (ácido sulfhídrico), es lactosa negativa, ureasa positiva e indol negativa (Koneman *et al.*, 1999). Estos bacilos no producen esporas. La mayoría de las cepas son móviles debido a que poseen flagelos peritricos que rodean a la célula (fig.7).

Es importante mencionar que parte de los múltiples rearrreglos genómicos que ha presentado *S. typhi* están asociados a la recombinación homóloga entre genes ribosomales. Este genoma dinámico puede ser significativo en la virulencia de *S. typhi*. (Liu y Sanderson 1995).



**Fig. 7.** Ilustración de *Salmonella typhi*, (tomada de <http://www.cdc.gov/media/subtopic/library/diseases.htm>)

## 5. Antecedentes

De acuerdo a diversos estudios encaminados a detectar material genético extracromosomal, se ha comprobado que *S. typhi* no es un buen hospedador de plásmidos, (Murray et al., 1985, Phipps *et al.*, 1991, Finch et al., 1992), al contrario de otras bacterias como *E. coli*, *Shigella* o incluso *S. Typhimurium* que frecuentemente contienen muchos plásmidos.

Se ha observado que *S. typhi* tiene la capacidad de recibir factores R de otras enterobacterias in vivo, especialmente mediante el mecanismo de conjugación (Datta *et al.*, 1981; Martínez *et al.*, 1987; Richards 1982; Schwalbe *et al.*, 1990; Ling *et al.*, 1992).

De los distintos tipos de plásmidos R, los del grupo de incompatibilidad HI1 se han encontrado asociados con el fenotipo multiresistente a antibióticos en los serovares invasivos más comunes de *Salmonella*: *S. typhi* y *S. paratyphi* (Holt *et al.* 2011). Por otra parte, las cepas de *S. typhi* son capaces de incorporar otros factores R de distinto grupo de incompatibilidad a aquellos HI1, provenientes de *E. coli* y otras especies bacterianas (Datta *et al.* 1981), pero varios estudios muestran que en estas cepas de *S. typhi*, dichos plásmidos se pierden rápidamente en comparación con otras especies de enterobacterias cuando no existe presión de selección. Por ejemplo, Murray *et al.* (1985) reportaron la inestabilidad de tres de cuatro plásmidos R originalmente encontrados en *E. coli* cuando se conjugaron en tres cepas distintas de *S. typhi*. Un estudio de Mendoza-Medellín *et al.*, 1993 demuestra que de una alta proporción de plásmidos de *E. coli* que fueron transferidos a cepas de *S. typhi* por medio de conjugación, un grupo de estos plásmidos se perdió rápidamente dentro de la población (tabla 1).

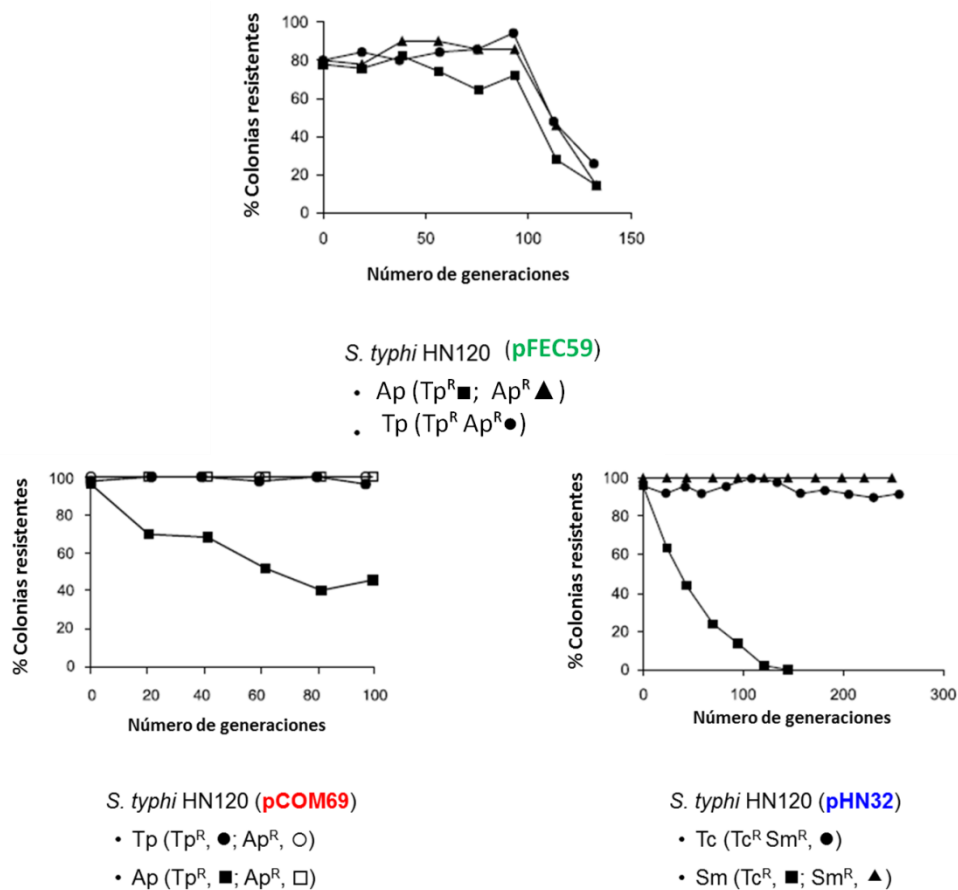
**Tabla 1. Clasificación de 17 plásmidos de *E. coli* con base en su estabilidad en *S. typhi* (Tomada y modificada de Mendoza *et al.*, 1993). J54: *E. coli* cepa silvestre y J55: *E. coli* cepa de laboratorio.**

Grupos de segregación de resistencia en <i>S. Typhi</i>				
R FACTOR FROM	% de colonias resistentes			
	S.TYPHY <sup>1</sup>	J55	<i>S.typhi</i> /J55	
<b>Grupo de baja segregación</b>	J54(COM51)	99.3	100.0	0.997
	J54(HN12)	100.0	100.0	
	J54(HN31)	100.0	100.0	
	J54(FEC103)	99.3	100.0	
	<b>Promedio</b>	<b>99.7</b>	<b>100.0</b>	
<b>Grupo de segregación intermedia</b>	J54(COM3)	56.0	92.0	0.530
	J54(COM13)	45.3	100.0	
	J54(COM18)	47.0	54.0	
	J54(COM36)	86.6	100.0	
	J54(COM47)	22.6	94.0	
	J54(COM68)	71.3	8.0	
	J54(COM190)	54.0	100.0	
	J54(HN59)	42.6	100.0	
	J54(FEC138)NxAp	22.0	100.0	
<b>Promedio</b>	<b>49.7</b>	<b>93.8</b>		
<b>Grupo de alta segregación</b>	J54(COM69)	0.0	94.0	0.023
	J54(HN32)	1.3	100.0	
	J54(HN144)	2.0	100.0	
	J54(FEC59)	5.3	96.0	
<b>Promedio</b>	<b>2.2</b>	<b>97.5</b>		

Promedio de 3 cepas de *S. Typhi*.

Posteriormente, de los plásmidos que se clasificaron en este reporte dentro del grupo de alta segregación se continuaron los estudios con tres de ellos, pFEC59 y pCOM69 resistentes a ampicilina (Ap) y trimetoprim (Tp) y pHN32 resistente a tetraciclina (Tc) y estreptomycin (Sm). Con la finalidad de explorar a mayor detalle el comportamiento de estos marcadores de resistencia se llevaron a cabo cultivos seriados de *S. typhi* HN120 con cada uno de los plásmidos seleccionando uno de los antibióticos para los cuales estos plásmidos tienen resistencia, con lo que se observó que para los plásmidos pCOM69 y pFEC59 la presencia de Ap no impide la pérdida de la resistencia a Tp (Tp<sup>R</sup>), pero la presencia de Tp<sup>R</sup> impide la pérdida de la resistencia a Ap (Ap<sup>R</sup>) (Fig. 8), de tal forma que la presencia de Tp en el medio de cultivo, permite

que ambos marcadores se mantengan en el plásmido. En el caso de los cultivos seriados de HN120 pHN32 se observó algo similar, en presencia de Tc, no se obtuvieron colonias sensibles a Sm ( $Sm^S$ ) y con Sm el número de colonias sensibles a Tc ( $Tc^S$ ) aumentó rápidamente (Fig. 8).

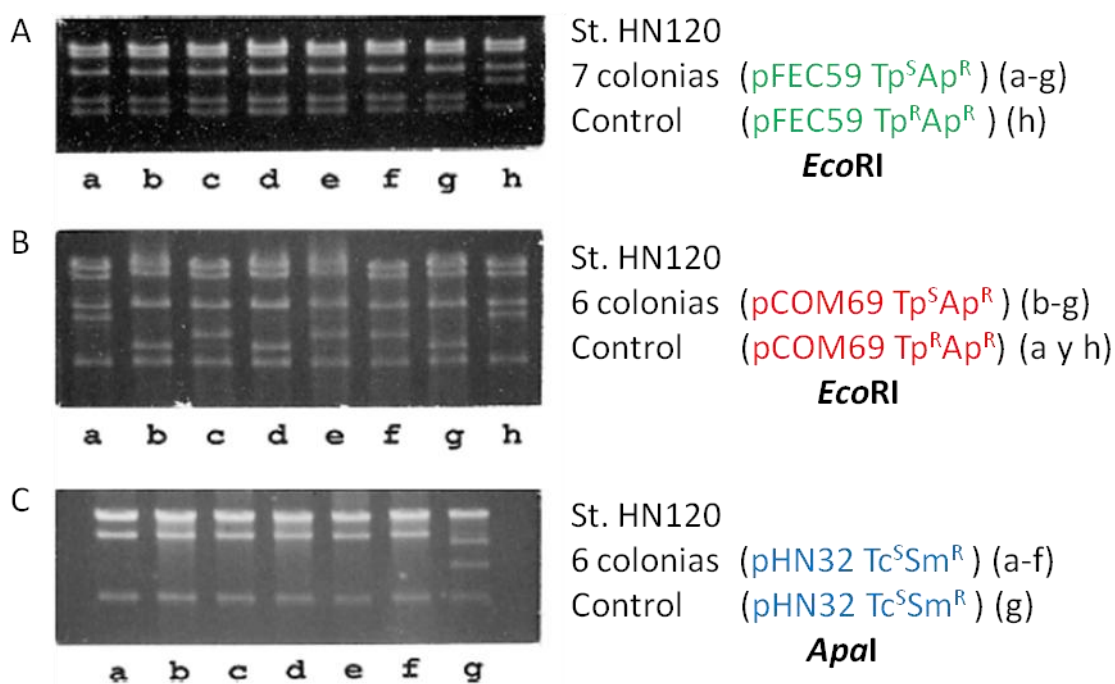


**Fig. 9.** Cultivo de las cepas portadoras de los plásmidos pCOM69 y pHN32 en presencia de los antibióticos Tp, trimetoprima; Ap, ampicilina; Tc, tetraciclina; Sm, estreptomina (Mendoza *et al.*, 2004).

Posteriormente se obtuvo el DNA plasmídico de clonas independientes provenientes de HN120 con pFEC9  $Tp^S Ap^R$ , pCOM69  $Tp^S Ap^R$ , y pHN32  $Tc^S Sm^R$  y se hizo electroforesis de cada uno con el correspondiente plásmido original, observándose que había una mayor movilidad en las bandas de los plásmidos  $Tp^S Ap^R$  o  $Tc^S Sm^R$ . Para

confirmar que había *deleciones* usaron endonucleasas de restricción y nuevamente se llevaron a cabo las electroforesis.

Los resultados demostraron la presencia de una *delección* en los derivados de Tp<sup>S</sup>, y se observó que en este caso en cada clon la *delección* es la misma (fig. 10A) por lo que se intuyó que el plásmido pFEC59 es eliminado de una manera única; este hecho no se observó con pCOM69 ya que las digestiones de los clones presentaron dos diferentes perfiles, sugiriendo que pCOM69 tiene dos tipos de *delección* asociadas al fenotipo Tp<sup>S</sup> (fig. 10B). En pHN32 digerido con *Apa*I también se observó *delección* (fig. 10C).



**Fig. 9.** Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos pFEC59, pCOM69 (Ap<sup>R</sup>Tp<sup>S</sup>) y pHN32 (Sm<sup>R</sup>Tc<sup>S</sup>) tratados con las endonucleasas *Eco*RI y *Apa*I respectivamente, obtenidos a partir de clonas independientes, en comparación con los plásmidos íntegros pFEC59, pCOM69 (Ap<sup>R</sup>Tp<sup>R</sup>) y pHN32 Sm<sup>R</sup>Tc<sup>R</sup>. Tp, trimetoprima; Ap, ampicilina; Tc, tetraciclina; Sm, estreptomina (tomada y modificada de Mendoza *et al.*, 2012).

Estas *deleciones* en los plásmidos conllevan a su pérdida completa en cepas HN120. Resulta interesante que cuando estos plásmidos han perdido una de las resistencias y son regresados a *E. coli*, se comportan tan estables como sus plásmidos parentales, con lo que se intuye que estas *deleciones* afectan mecanismos de estabilidad en *S. typhi* pero no en *E. coli*; por lo cual dichos mecanismos deben ser específicos de *E. coli* y encontrarse ausentes en *S. typhi*, (Mendoza *et al.*, 2004).

Posteriormente se comprobó que la *delección* del plásmido es un proceso dependiente de recombinación llevada a cabo por la enzima recombinasa A (RecA), ya que no se detectó este suceso en cepas derivadas de *S. typhi* RecA-deficientes que contenían los plásmidos correspondientes y tampoco perdieron sus marcadores de resistencia por lo que se propuso que los segmentos eliminados contienen información para la estabilidad plasmídica en *S. typhi*.

Por otro lado, para encontrar una explicación de porqué en *E. coli* no se presenta una pérdida de los marcadores de resistencia ni del plásmido, (tomando en cuenta que la inestabilidad plasmídica en *S. typhi* es un fenómeno dependiente de recombinación) se comparó el potencial recombinogénico de *S. typhi* y *E. coli* para descartar que una posible actividad hiper-recombinogénica en cepas de *S. typhi* causara la dimerización y segregación plasmídica. Esto se hizo comparando los perfiles de oligomerización de pUC19 entre sus derivados de *S. enterica typhi* HN120, *E. coli* J55, y *E. coli* JM109.

No habiendo mayor recombinación en *S. typhi* que en *E. coli*, se especula que el sitio de la *delección* sea estable en ésta y que existan mecanismos de recombinación en *S. typhi* diferentes a los de *E. coli*, como la existencia de una enzima de recombinación específica, y que esta información para la estabilidad plasmídica se encuentre codificada en los segmentos que son eliminados en los plásmidos cuando están presentes en *S. typhi*.



### III. JUSTIFICACIÓN

Encaminados a entender los mecanismos presentes en bacterias con un genoma dinámico como lo es el de *Salmonella*, proponemos que el fenómeno de recombinación diferencial observado entre *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* a nivel de plásmidos R, será una herramienta útil para el estudio de rearrreglos genómicos.

Por otro lado, la aparición de diversas clases de resistencia en múltiples especies bacterianas a propiciado que hoy en día exista un grave problema de salud (Ang *et al.*, 2004), ya que parte de la resistencia a antibióticos se origina en plásmidos o se adquiere por medio de éstos (Frost *et. al.*, 2005). Es por ello que resulta importante comprender los mecanismos estabilizadores de estos plásmidos y así brindar herramientas para abordar el problema desde una nueva perspectiva.

### IV. HIPÓTESIS

Eventos recombinogénicos causan inestabilidad de tres plásmidos R en *S. typhi* y ocasionan la pérdida o modificación de ciertas regiones en los plásmidos, se propone que estos eventos se llevan a cabo en sitios discretos, por lo que mediante patrones de restricción será posible llevar a cabo un mapeo de las regiones eliminadas, regiones donde se sugiere que se encuentran los mecanismos estabilizadores.

### V. OBJETIVOS

#### **Objetivo general:**

Determinar el tamaño de tres plásmidos R (pFEC59, pCOM69 y pHN32), así como encontrar y describir mediante patrones de restricción, las zonas que al perderse en *S. typhi* los inestabilizan.

### **Objetivos particulares:**

- 1) Definir el tamaño de los tres plásmidos R (pFEC59, pCOM69 y pHN32) mediante técnicas de electroforesis y patrones de restricción.
- 2) Aislar plásmidos recombinantes derivados, mediante la selección diferencial con antibióticos.
- 3) Mediante patrones de restricción, definir la estructura general de los plásmidos antes y después del evento recombinogénico, estimando el tamaño y movilidad de las regiones eliminadas mediante electroforesis.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Cultivo de cepas**

#### *Cepas utilizadas:*

Se emplearon 4 cepas de *Salmonella typhi*

*Salmonella typhi* HN120 Rif<sup>R</sup>/ pFEC59 Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>

*Salmonella typhi* HN120 Rif<sup>R</sup>/ pCOM69 Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>

*Salmonella typhi* HN120 Rif<sup>R</sup>/ pHN32 Tc<sup>R</sup> Str<sup>R</sup>

Cepas control:

*Salmonella typhi* HN120

*Salmonella typhimurium* LT2

Las cepas control se adquirieron del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas del cepario del Doctor Camacho Carranza R. Las cepas de *S. typhi* con los plásmidos conjugados fueron proporcionadas por el Doctor Mendoza Medellin A.

Se preparó agar nutritivo NB (Nutrient Broth) en cajas Petri para sembrar las cepas por duplicado, al solidificarse se agregaron los respectivos antibióticos; dependiendo de la resistencia de cada plásmido se espatularon los concentrados líquidos de los antibióticos sobre las cajas Petri. Únicamente el Bactim (tripetoprim y sulfametoxazol 5:1) se agregó en polvo al agar NB antes de solidificar.

*Salmonella typhimurim* LT2 se sembró en medio NB sin antibiótico y en medio mínimo de sales M9 con cada uno de los antibióticos por separado, para probar el funcionamiento de éstos.

Se dejaron secar las placas 20 minutos aproximadamente y se sembraron las cepas en sus respectivas cajas por el método de estría cruzada para obtener colonias aisladas. Se incubaron a 37°C durante 24 horas.

### **1.1 Antibióticos**

Las concentraciones finales de los antibióticos (tomadas de Mendoza M., *et al.*, 2004; Stanley R., *et al.*, 1996) fueron:

Ampicilina (100µg/mL)

Tetraciclina (25µg/mL)

Estreptomina en agua (100µg/mL)

Bactrim (10µg/mL)

Todos los antibióticos utilizados fueron de Sigma-Aldrich.

### **Medios de cultivo**

1. Medio agar nutritivo NB

Agar 1.5%, NaCl 0.5%, NB 88%.

## 2. Medio mínimo de sales M9

CaCl<sub>2</sub> 1M, Tiamina HCl 1%, MgSO<sub>4</sub> 1M, sales M9 5X (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl), glucosa 20%, agar 15 g/L.

## 2. Desarrollo del método de Eckhardt

Se utilizó el método de Eckhardt debido a que es un método en el cual la lisis de la célula se lleva a cabo directamente en el gel de agarosa, lo cual aumenta las posibilidades de extraer el plásmido íntegro. Justo antes de la electroforesis se lleva a cabo la lisis celular. Puede ser aplicado a diversos sistemas bacterianos y permite observar los plásmidos que se encuentren en diferentes topoisómeros o agregados (Eckhardt 1978).

Los cultivos se dejaron crecer hasta una densidad óptica de 0.2 leída a 620nm en el espectrofotómetro. Se tomó 1 mL de cada muestra, se colocaron en microtubos y a cada muestra se le dio el siguiente tratamiento:

Se centrifugó durante 3 min a 13 kilo revoluciones por minuto (Krpm) en una centrífuga (Hettich zentrifugen, modelo mikro 200R, rotor 2424-B) a 4°C, se le retiró el sobrenadante con una jeringa y a la pastilla celular se le agregaron 500 µL de agua fría.

Se resuspendió la pastilla y se les agregó 1 mL de N-lauryl sarcosine al 0.3% frío y se mezcló por inversión. Se centrifugó 3 min a 13 Krpm, se retiró el sobrenadante y se incubó 10 min a -20 °C, transcurrido este tiempo se le agregaron a la pastilla celular 40 µL de Ficoll al 20% y 10 µL de solución de lisis para enseguida cargar las muestras en un gel horizontal el cual previamente se había dejado correr con 25 µL de SDS al 10% (en cada pozo donde irían las muestras) durante 20 minutos con los polos invertidos a un voltaje de 100 V.

Las condiciones de electroforesis fueron siendo modificadas continuamente en diferentes pruebas ya que se necesitaron de varias repeticiones para optimizar el método y éste se estandarizó tomando en cuenta las condiciones usadas por Eckhardt, T. (1978), Espuny, M.R. (1987) y Wheatcroft *et. al.*, (1990).

### **Soluciones**

1. Buffer Tris-Boratos (TB) pH 8.2

Tris 89mM, Na<sub>2</sub>EDTA 2.5mM, Ácido Bórico 89mM, H<sub>2</sub>O 1000 ml.

2. Buffer TE pH 8.3

Tris 10mM, EDTA 1mM.

3. N-lauryl sarcosine 0.3% (0.3 g/100 mL H<sub>2</sub>O).

4. Ficoll (WT 400) 20% en TE.

5. Solución de lisis

RNAsa A 0.4 mg/mL, azul de bromofenol en TE 1 mg/mL, lisozima 10 mg/mL.

6. SDS 10%

SDS 10% en H<sub>2</sub>O, Xylen cyanol 0.25%.

### **3. Marcador de peso molecular para el método de Eckhardt**

Sabiendo que los plásmidos buscados son de aproximadamente 100 kb, para localizar en qué nivel del gel aproximadamente se encontrarían, se utilizó la cepa *Salmonella typhimurium* LT2 que contiene al plásmido pSLT, un plásmido críptico de 91 kb (Brown *et. al.*, 1986) con esta cepa se hicieron bloques de agarosa

### ***3.1 Preparación de DNA bacteriano embebido en agarosa***

Se dejó crecer la cepa en medio NB toda la noche, se centrifugó 1 mL durante 5 min a 800 RPM y se resuspendió en 0.5 mL de buffer de suspensión celular, posteriormente se mezcló la suspensión celular con 0.5 mL de agarosa de bajo punto de fusión al 1.0% (previamente preparada y mantenida a 70°C). Se homogeneizó la mezcla y fue agregada a los moldes, (plug mold BIO-RAD)

Los bloques se dejaron gelificar a temperatura ambiente, fueron removidos del molde y se colocaron dentro de una caja petri, donde se les agregó solución de lisis hasta cubrirlos, se dejaron incubar por tres horas a 65°C en agitación constante.

Se removió la solución de lisis y se agregó solución de lisozima nuevamente hasta cubrir los bloques, se incubó toda la noche a temperatura ambiente y en agitación. Al siguiente día, los bloques de agarosa fueron lavados con solución de lavado dos veces durante 20 minutos. Se agregó solución de proteinasa K hasta cubrir los bloques y se incubó durante dos días a 42 °C en agitación.

Se repitió el lavado y se agregó solución de PMSF dejándolos incubar durante una hora. Se lavaron por última ocasión los bloques para guardarlos en solución de almacenamiento a 4°C.

### ***3.2 Digestión del DNA bacteriano embebido en agarosa con enzimas de restricción***

Previo a la digestión se llevaron a cabo cinco lavados de los bloques, de 30 minutos cada uno en agua destilada, para eliminar todo el EDTA. Para la digestión se usó la enzima *Xba*I, agregando 20 unidades de enzima por 100 µL de buffer (Invitrogen 10X REACT2) en un microtubo estéril por cada bloque y se dejaron incubar a 37°C durante toda la noche.

## **Soluciones**

### 1. Solución de suspensión celular pH 8.5

Tris HCL 10mM, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 100mM, NaCl 20mM

### 2. Agarosa

Agarosa SeaKem GTG 1.0% (high strength analytical grade agarosa BIO-RAD) disuelta en buffer de suspensión celular.

### 3. Solución de lisis pH 7.2

Tris HCL 10mM, EDTA 100mM, NaCl 50mM, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 0.2%, Sarcosyl 0.5%

### 4. Solución de lavado pH 8

Tris HCL 20mM, EDTA 50mM

### 5. Solución de proteinasa K

Proteinasa K en solución de lavado 1 mg/mL

### 6. Solución de PMSF

PMSF en solución de lavado 1mM. PMSF disuelto previamente en isopropanol.

### 7. Solución de almacenamiento

Solución de lavado diluida 1:10

### 8. Enzima *Xba*I (Invitrogen 10 U/ $\mu$ L) con buffer de Invitrogen 10X REACT2

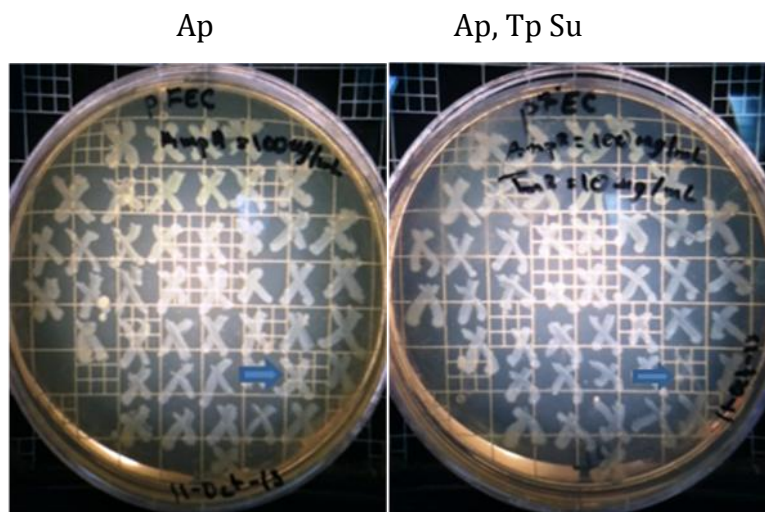
Los moldes utilizados recibieron un tratamiento de lavado con agua estéril antes de su utilización, para dejarlos libres de DNAsas, RNAsas, DNA, etc.

#### 4. Obtención de plásmidos recombinantes derivados.

Con un asa de siembra se tomó muestra de una colonia de la cepa elegida, se inoculó y se dejó incubar toda la noche en 5 mL de medio NB con el antibiótico de la resistencia que se seleccionó (ampicilina para HN120/pCOM69, HN120/pFEC59 y estreptomomicina para HN120/pHN32) a 150 rpm a 37°C.

Para obtener más generaciones, se diluyó la cepa 1/1,000 y se dejó incubar toda la noche bajo las mismas condiciones, este paso se repitió las veces necesarias para cada caso hasta observar que se perdiera una de las resistencias. Posteriormente, la última cepa obtenida se diluyó 1/1000 y se sembraron 40 µL de la muestra en placa con el antibiótico seleccionado, se incubaron a 37°C por 24 hrs.

Se tomó una muestra de las diferentes colonias obtenidas y se sembraron en una placa de agar nutritivo NB con los dos antibióticos de la cepa original y en otra placa con el antibiótico seleccionado. Las que crecieron en ambas placas se descartaron y de aquellas colonias donde sólo hubo crecimiento en placa con el antibiótico seleccionado se tomó una muestra (como se observa en la figura 10) y se incubó nuevamente toda la noche para posteriormente hacer el procedimiento de lisis alcalina.



**Fig. 10.** Ejemplo de la elección de colonias mediante selección diferencial de antibióticos.



Todo el procedimiento se repitió 5 veces para cada cepa, partiendo de colonias aisladas para encontrar diferentes recombinantes de cada plásmido.

#### ***4.1 Cálculo de generaciones bacterianas***

Conociendo el tamaño de la población inicial y final con un factor de 2 como medida de expansión generacional, fue calculado el número de generaciones bacterianas acumuladas en el que se perdía una de las dos resistencias para cada caso ( fórmula en anexo 1).

### **5. Extracción de plásmidos por lisis alcalina con SDS: Minipreparación**

Este es un método para obtener DNA plasmídico a partir de una pequeña muestra de cultivo bacteriano, gracias a un medio alcalino y SDS (Sambrook y Russell 2001)

Cada una de las cepas se sembró en un tubo de ensaye con 5mL de medio NB y los respectivos antibióticos para cada caso. Se incubaron toda la noche en un agitador a 37°C y 150 rpm.

Posteriormente se realizó lo siguiente para cada una de las cepas:

Se tomaron 1.5 mL del cultivo y se pasaron a un microtubo, se centrifugó a 13,000 rpm, a 4°C durante 2 min. Después de la centrifugación se removió el medio por decantación, con cuidado para que la pastilla no se desprendiera. La pastilla se resuspendió en 100  $\mu$ L de la solución de lisis I agitando vigorosamente, a continuación se añadieron 200  $\mu$ L de la solución de lisis II, (la cual fue preparada minutos antes de su utilización) se mezcló por inversión aproximadamente 5 veces y se dejó reposar en hielo por 5 min. A esta suspensión se le agregó la solución de lisis III fría, se mezcló por inversión y nuevamente se dejó reposando por 5 min.

La suspensión con bacterias lisadas se centrifugó a 13,000 rpm, a 4°C durante 5 min y la fase acuosa resultante se transfirió a un tubo limpio con la ayuda de una micropipeta. Posteriormente, para dejar la muestra más limpia se agregó un volumen 1:1 de fenol: cloroformo, se mezclaron ambas fases por inversión y se centrifugó bajo las condiciones antes mencionadas para después transferir nuevamente la fase acuosa superior a un tubo limpio.

A continuación se precipitaron los ácidos nucleicos: añadiendo dos volúmenes de etanol a la muestra, mezclando por inversión dejando reposar por 5 min en frío, después se centrifugó bajo las mismas condiciones y se decantó la fase acuosa. Posteriormente el tubo se mantuvo abierto a temperatura ambiente hasta que se secan todos los residuos de etanol y cuando hubo sucedido esto se le añadió 1 mL de etanol al 70%, nuevamente se mezcló por inversión se centrifugó bajo las mismas condiciones, se decantó la fase acuosa y se dejaron secar los residuos.

Por último la pastilla de ácidos nucleicos se resuspendió en 50 µL de TE (pH 8.0) y se almacenó a -20 °C

### ***Soluciones***

1. Solución de lisis alcalina I

Glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM pH 8.0, EDTA 10mM pH 8.0, NaCl 20mM.

Se esterilizó por filtración con membrana de 0.45 µm y se almacenó a 4°C.

2. Solución de lisis alcalina II

NaOH 0.2N, SDS 1%.

Se preparó al momento y se utilizó a temperatura ambiente.

3. Solución de lisis alcalina III

Acetato de potasio 5 M 30.0 mL, ácido acético glacial 5.75 mL, H<sub>2</sub>O 14.25 mL.

Se esterilizó por filtración con membrana de 0.45 µm y se almacenó a 4°C.

4. Fenol:cloroformo (1:1, v/v)

5. Buffer TE pH 8

Tris 10mM, EDTA 1mM.

## **6. Electroforesis de los plásmidos extraídos por lisis alcalina**

### ***6.1 Electroforesis convencional***

Se preparó un gel de agarosa a una concentración de 0.5 %, se vertió en el molde de la cámara de electroforesis y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 30 minutos, el gel se colocó dentro de la cámara, (*Hoefer HE 33 Mini Submarine Unit, Amersham Biosciences*). Las muestras se descongelaron y se cargaron en los pozos del gel, también se cargaron muestras de los marcadores de peso molecular. El gel se cubrió con buffer TBE y las condiciones de corrida fueron 100 V por aproximadamente 1 hora, al finalizar se tiñeron los geles sumergiéndolos por tres minutos en una solución concentrada de bromuro de etidio y se enjuagaron con agua destilada por 20 minutos, posteriormente se colocaron sobre una base con luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara digital marca Kodak .

### ***6.2 Electroforesis en campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE).***

Esta permite la resolución de grandes fragmentos de DNA que no pueden ser resueltos por electroforesis en gel convencional. El procedimiento implica la aplicación de campos eléctricos controlados que cambian de dirección en un ángulo predeterminado a las muestras de DNA que ha sido introducidas en una matriz de gel de agarosa y se digerido con una endonucleasa de restricción. El ajuste de las condiciones de electroforesis permite la separación de fragmentos de DNA con longitudes de 10 kb hasta 9 megabases dependiendo del tamaño del gel. (Frances O'Brien *et. al.*, 2007).

En este caso se utilizó un marcador que definiese altos pesos moleculares, se preparó un gel de agarosa Certified Megabase al 1.0% donde se colocó el marcador embebido en agarosa, el cual fue sellado con la misma agarosa con la que hizo el gel. Una vez colocadas las muestras, el gel fue sumergido en buffer TBE 0.5X contenido dentro de la cámara de electroforesis (*Bio Rad-DRII®*, *contour-clamped homogeneous electric field apparatus*). Se usaron diferentes programas para poder estandarizar el que permitiera observar el tamaño de los plásmidos buscados. El programa adecuado fue: rampa 1-25 seg. por 20 hrs, voltaje: 6 V/cm, ángulo: 120°, temperatura :14° C y velocidad de la bomba: 0.75 L/min.

### **Soluciones**

1. Certified Megabase Agarose (Bio-Rad)
2. Buffer TBE 1x  
Tris 90mM, EDTA 2mM (sigma), Ácido Bórico 90mM (sigma)
3. Marcador de peso molecular: Midrange PFG Marker I (New England Biolabs)

### **7. Preparación de Ribonucleasa A**

Al preparar la solución, ésta se hierva para eliminar DNasas: Se preparó una solución concentrada, (10 mg/mL) adicionando 50 mg de ribonucleasa A en polvo en 5 mL de buffer de acetato de sodio de bajo pH (para evitar precipitación al calientarse). Se calentó a 100°C por 15 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y para aumentar el pH se le adicionó 0.1% de Tris-HCl. Para finalizar se alicuotó en 5 tubos microtubos y se almacenó a -20°C (Sambrook y Russell 2001). Se usaron 0.3 µL en cada muestra, 30 min antes de cargarlas en el gel de electroforesis, dejándolas a 37°C durante este tiempo.

## **Soluciones**

1. Ribonucleasa A de páncreas bovino (Sigma-Aldrich)

2. Buffer de acetato de sodio 10 mM, pH 5.2

Acetato de sodio, Tris-HCL 1 M pH 7.4

### **8. Enzimas de restricción**

Las enzimas de restricción, también conocidas como endonucleasas, son proteínas con actividades enzimáticas que cortan los enlaces fosfodiéster del material genético a partir de una secuencia que reconocen (Lodish *et al.*, 2005).

De acuerdo a la concentración en la que se encontraba cada enzima según el proveedor, se usó la cantidad necesaria (comúnmente una unidad) para realizar los cortes de las muestras de plásmidos que usualmente eran de 10  $\mu$ L. Los buffers de cada enzima, los cuales se encuentran a una concentración de 10X, se diluyeron 10 veces y las muestras se dejaron 1 hora a 37°C.

La elección de las enzimas utilizadas se llevó a cabo por ensayos, ya que no se conoce la secuencia de los plásmidos estudiados, se hicieron pruebas con múltiples enzimas digiriendo los plásmidos y se eligieron las enzimas que proporcionaron patrones de bandedo suficientes y distinguibles para el análisis.

Las enzimas utilizadas fueron:

**Tabla 2. Información de las enzimas utilizadas.**

<b>Enzima</b>	<b>Secuencia de reconocimiento</b>	<b>Buffer</b>	<b>Compañía</b>
<i>EcoRI</i> 20U/μL	5' G/AATTC 3' CTTAA/G	NE Buffer <i>EcoRI</i> (10X)	New England Biolabs
<i>HindIII</i> 10U/μL	5' A/AGCTT 3' TTCGA/A	NE Buffer 2 (10X)	New England Biolabs
<i>Sau3AI</i> 5U/μL	5' /GATC 3' CTAG/	NE Buffer 1 (10X)	New England Biolabs
<i>SbfI</i> 10U/μL	5' CCTGCA/GG 3' GG/ACGTCC	NE Buffer CutSmart (10X)	New England Biolabs
<i>AscI</i> 10U/μL	5' GG/CGCGCC 3' CCGCGC/GG	NE Buffer CutSmart (10X)	New England Biolabs
<i>NotI</i> 10U/μL	5' GC/GGCCG 3' CGCCG/GC	NE Buffer 3.1 (10X)	New England Biolabs
<i>BamHI</i> 10U/μL	5' G/GATCC 3' CCTAG/G	NE Buffer 3.1 (10X)	New England Biolabs
<i>AvaiI</i> 10U/μL	5' G/GWCC 3' C/CWGG	NE Buffer 2 (10X)	New England Biolabs
<i>XbaI</i> 10U/μL	5' T/CTAGA 3' AGATC/T	Buffer invitrogen (10X) REACT2	Invitrogen

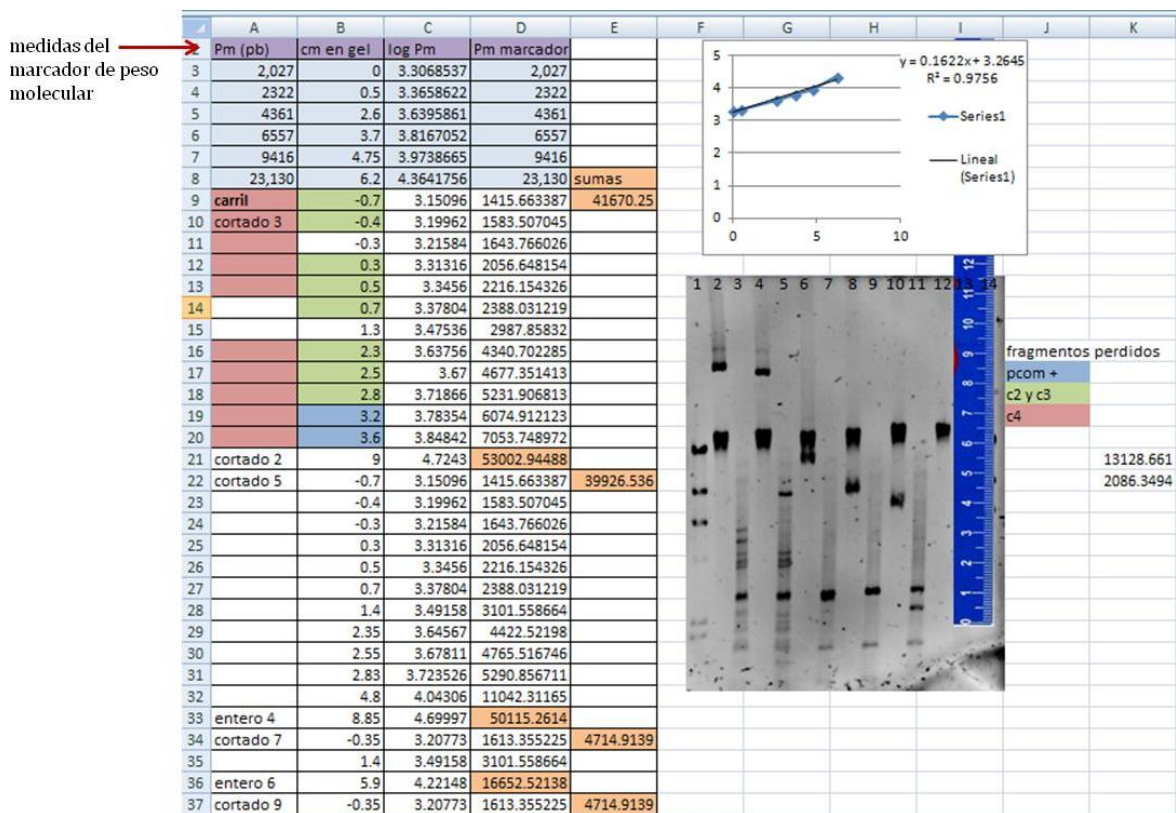
El marcador molecular utilizado fue el fago Lambda (Lambda DNA Invitrogen) digerido con la enzima *HindIII*.

## 9. Análisis de resultados en Excel

Para determinar el peso molecular de las bandas obtenidas en los geles de agarosa, las imágenes de éstos se analizaron en el programa Microsoft Excel. Con una regla se tomaron las medidas del marcador molecular en centímetros, marcando sus valores en pares de bases y transformándolos en logaritmo.

Con la comparación de estas dos columnas de datos se obtuvo una escala y se calculó la ecuación de la recta, con lo que fue posible tomar la medida en centímetros de cada

banda en el gel y convertirla a pares de bases. De esta manera interpolando en la recta se estimó el tamaño de los plásmidos y de los fragmentos modificados (fig. 11).

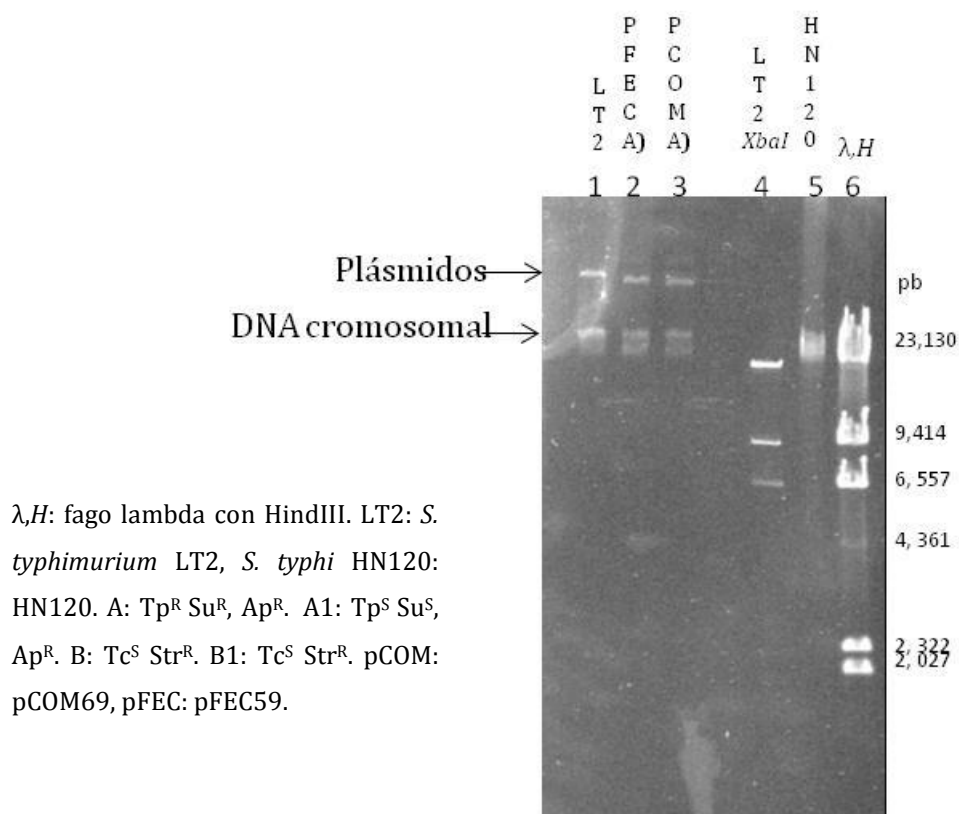


**Fig. 11.** Ejemplo del análisis para calcular el peso molecular de las bandas en los geles de electroforesis, con una flecha en la parte superior se indican las medidas del marcador molecular en pares de bases, a un lado su respectiva medida de migración en centímetros en el gel y posteriormente su medida logarítmica.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSION

### Estandarización de la electroforesis tipo Eckhardt

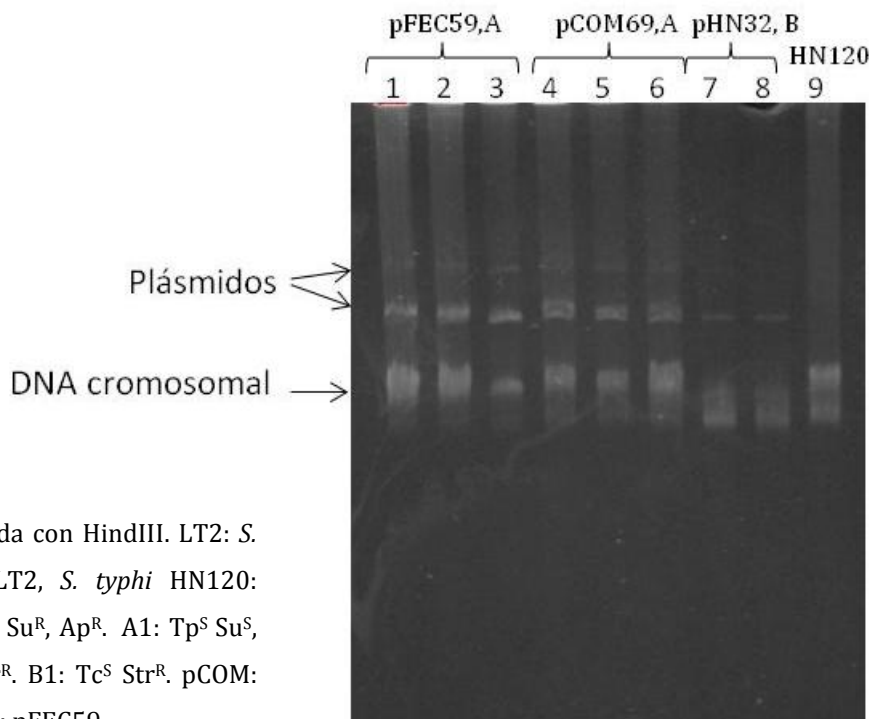
Las condiciones para poder visualizar los plásmidos de las cepas con electroforesis tipo Eckhardt fueron: gel de agarosa a una concentración de 0.5%, una corrida a 40 V durante 50 minutos y a 105 V durante 8 horas, lo cual puede observarse en la figura 12, que muestra los marcadores de peso molecular y los plásmidos esperados, demostrándolo con la cepa *S. typhi* HN120 que no contiene a los plásmidos y la cepa *S. typhimurium* LT2 que contiene el plásmido pSLT, cuyo peso sabemos que es de 94 Kb y parece aproximarse a los pesos de pCOM69 y pFEC59.



**Fig. 12.** Electroforesis tipo Eckhardt de: 1) LT2, 2) *S. typhi* HN120/pFEC59 A, 3) *S. typhi* HN120/pCOM69 A, 4) LT2 con *Xba*I 5) *S. typhi* HN120, 6)  $\lambda$ ,H.



Para poder estimar el tamaño de los plásmidos se llevaron a cabo digestiones de éstos con endonucleasas, se recortaron del gel las regiones que contenían los plásmidos obtenidos (fig. 13) y posteriormente se usaron enzimas de restricción, pero no fue posible ver las digstiones en gel de electroforesis, aun cuando las muestras fueron tratadas con una solución de proteinasa K (1.21mg/mL) por 24 hrs para eliminar posibles proteínas que interfirieran con las digestiones. Quizá el gel de agarosa interfirió en la acción de las enzimas de restricción al no poder entrar éstas a través del gel y por eso no se observaron restricciones. En la figura 13 se observa como ahora los plásmidos pFEC59 y pCOM69 presentan dos configuraciones espaciales distintas o se encuentran en forma de dímeros o multímeros (Dale *et al.*, 2004).



$\lambda, H$ : fago lambda con HindIII. LT2: *S. typhimurium* LT2, *S. typhi* HN120: HN120. A: Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>. A1: Tp<sup>S</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup>. B: Tc<sup>S</sup> Str<sup>R</sup>. B1: Tc<sup>S</sup> Str<sup>R</sup>. pCOM: pCOM69, pFEC: pFEC59.

**Fig. 13.** Electroforesis tipo Eckhardt, de cepas de *S. typhi*: 1), 2) y 3) pFEC59 A, 4), 5) y 6) pCOM69 A, 7) y 8) pHN32 B, y 9) HN120.

## Extracción plasmídica mediante lisis alcalina

Habiendo comprobado que los plásmidos buscados son observables mediante el método de Eckhardt pero que éste no es suficiente para poder estimar su peso molecular mediante patrones de restricción dado que el gel de agarosa pudiese estar interfiriendo en la acción de las enzimas de restricción, se llevó cabo el método de extracción plasmídica mediante lisis alcalina, con el fin de obtener los plásmidos más limpios y aumentar la eficacia de las restricciones.

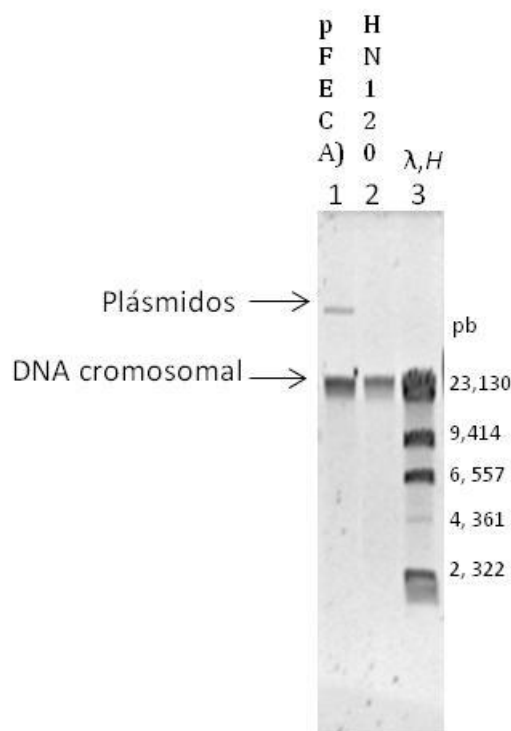
En la figura 14 se muestra que por lisis alcalina es posible obtener los plásmidos.

## Plásmidos recombinantes derivados

Después de dejar crecer a *S. typhi* con cada uno de los plásmidos y con tan solo uno de los dos antibióticos en el medio (aquel que permite la pérdida del segundo) se obtuvo el número de generaciones necesarias para que *S. typhi* pierda una de las dos resistencias conferidas y se observó

que este número es diferente para cada plásmido. Con el plásmido pHN32 se presentan individuos sin una de las resistencias a las 67 generaciones, con pCOM69 se

requiere de 103 generaciones aproximadamente y con pFEC59 121 generaciones (tabla 3) (gráficas en anexo 2). Lo cual concuerda con los resultados reportados por



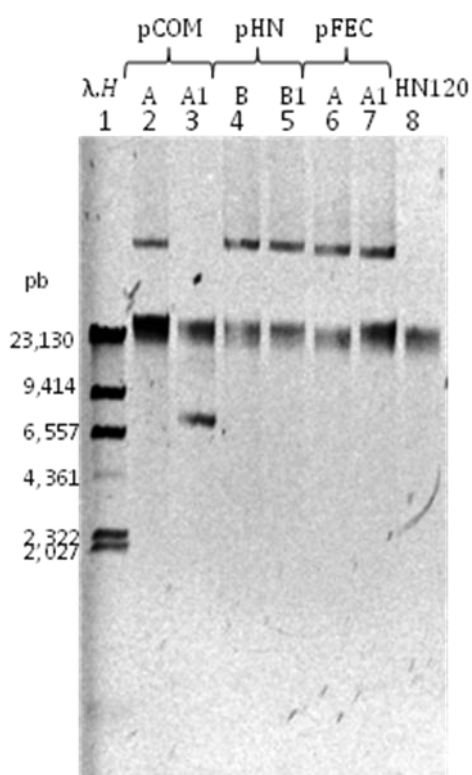
**Fig. 14.** Electroforesis de lisis alcalina de *S. typhi*: 1) pFEC59, A 2) HN120 3)  $\lambda, H$ .  $\lambda, H$ : fago lambda con *Hind*III. A:  $Tp^R$   $Su^R$ ,  $Ap^R$ , *S. typhi* HN120: HN120.

Mendoza *et al.* (2004) donde se reportó que la cinética en la pérdida de los marcadores para cada plásmido es diferente.

**Tabla 3. Cálculo de generaciones necesarias para perder una de las resistencias**

Periodos 12 hrs.	Población inicial	Población final	Generaciones pFEC59	Generaciones pCOM69	Generaciones pHN32
1	2.00E+05	2.00E+09	13.28771238	13.28771238	13.28771238
2	8.00E+03	2.00E+09	17.93156857	17.93156857	17.93156857
3	8.00E+03	2.00E+09	17.93156857	17.93156857	17.93156857
4	8.00E+03	2.00E+09	17.93156857	17.93156857	17.93156857
5	8.00E+03	2.00E+09	17.93156857	17.93156857	
6	8.00E+03	2.00E+09	17.93156857	17.93156857	
7	8.00E+03	2.00E+09	17.93156857		
Total de generaciones acumuladas			120.8771238	102.9455552	67.08241809

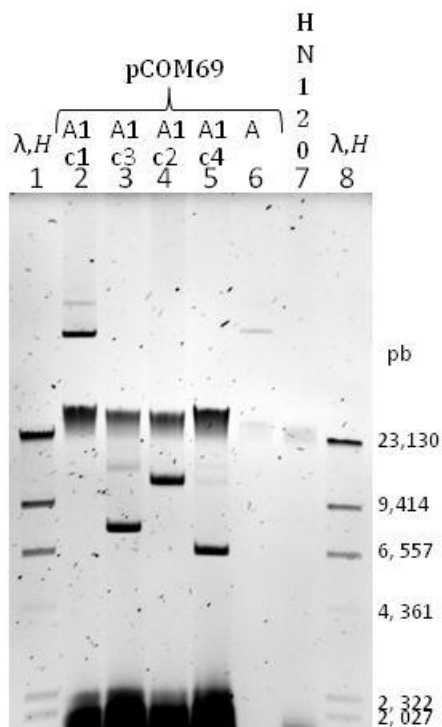
Al obtener plásmidos recombinantes derivados de los tres plásmidos originales, mediante la selección diferencial con antibióticos y correrlos en un gel, se encontró que el plásmido pCOM69 al perder la resistencia a Tp, Su disminuye su peso molecular en gran medida, con lo que se podría sugerir que un gran segmento se está perdido en el proceso de recombinación. Sin embargo en el caso de los plásmidos pFEC59 y pHN32 no se observa una notoria diferencia en el peso molecular después de la pérdida de la resistencia (fig. 15).



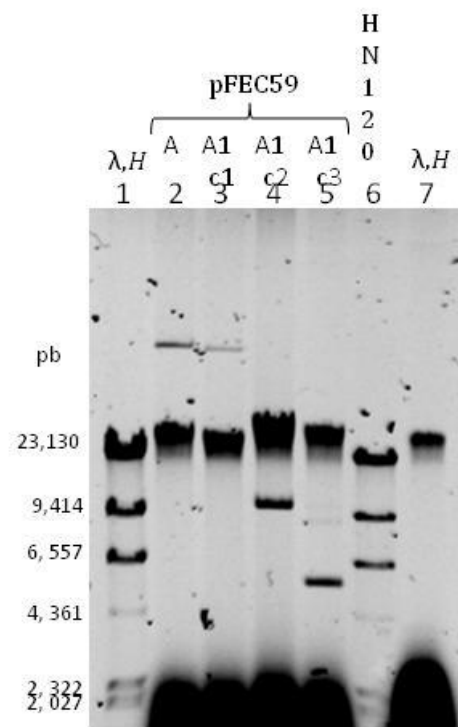
**Fig. 15.** Electroforesis de: 1)  $\lambda$ ,H. *S. typhi* con plásmidos: 2) pCOM69 A, 3) pCOM69 A1, 4) pHN32 B, 5) pHN32 B1, 6) pFEC59 A, 7) pFEC59 A1 y 8) HN120.  $\lambda$ ,H: fago lambda con *Hind*III, A: Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>, A1:Tp<sup>S</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup>, B: Tc<sup>R</sup> Str<sup>R</sup>, B1: Tc<sup>S</sup> Str<sup>R</sup>, *S. typhi* HN120: HN120

Se buscaron mas variantes estructurales de los plásmidos en la perdida de la resistencia para cada plásmido partiendo de colonias independientes, el plásmido pCOM69 al perder la resistencia a Tp Su presenta un total cuatro patrones diferentes, los cuales fueron nombrados como clonas (c) (fig. 16). C1 (carril 2) es muy similar en peso al plásmido original (carril 6). En cuanto al resto de las clonas podría interpretarse como la presencia de *deleciones* de diferentes tamaños que vuelven inestable al plásmido tal como lo menciona Dale *et. al.* (2004), ya que en c2, c3 y c4 el peso molecular parece disminuir.

Se observan en total tres perfiles diferentes para la pérdida de una de las resistencias en el caso del plásmido pFEC59 (fig. 17). Y al igual que el caso de pCOM69 uno de los patrones (c1) es muy parecido al plásmido original y en los otros dos (c2 y c3) parece haber *deleciones* más grandes.

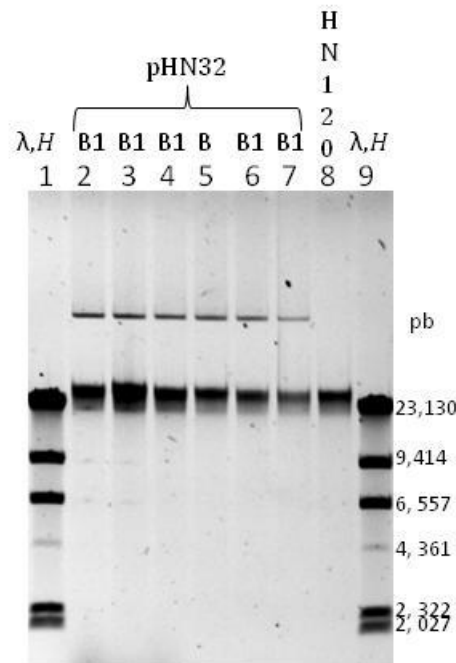


**Fig. 16.** Electroforesis de: 1) y 8)  $\lambda,H$ . En los carriles siguientes *S. typhi* : 2, 3, 4 y 5) clonas diferentes con el plásmido pCOM69 A1, 6) pCOM69 A, y 7) HN120. C:clona.  $\lambda,H$ : fago lambda con *Hind*III, A: Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>, A1:Tp<sup>S</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup>, *S. typhi* HN120: HN120.



**Fig. 17.** Electroforesis de: 1) y 7)  $\lambda,H$ . En los carriles siguientes *S. typhi* : 2) pFEC59 A, 3, 4 y 5) clonas diferentes con el plásmido pFEC59A1, 6) HN120. C:clona.  $\lambda,H$ : fago lambda con *Hind*III, A: Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>, A1:Tp<sup>S</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup>, *S. typhi* HN120: HN120.

Los plásmidos pHN32 Tc<sup>S</sup>, Sm<sup>R</sup> obtenidos de cinco colonias diferentes de *S. typhi*, parecen tener el mismo peso molecular entre ellos (fig. 18), podría ser que sólo existe un patrón en la pérdida de la resistencia, el cual es resultado de *deleciones* muy pequeñas. Cabe recordar que de los tres plásmidos pHN32 es el primero en perder una resistencia a lo largo de las generaciones.



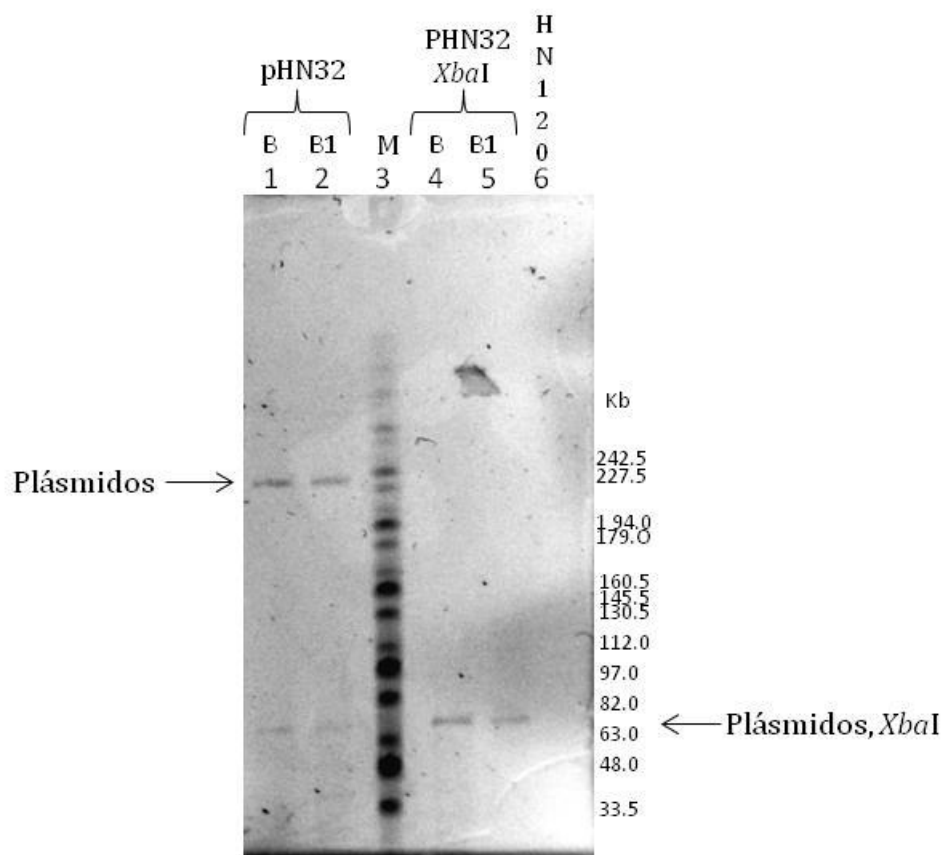
**Fig. 9.** Electroforesis de: 1) y 9) λ,H. En los carriles siguientes *S. typhi* : 2, 3, 4, 6 y 7) clonas diferentes con el plásmido pHN32 Tc<sup>S</sup>, Sm<sup>R</sup>, 5) pHN32Tc<sup>R</sup>, Sm<sup>R</sup>, 8) HN120. λ,H: fago lambda con *Hind*III, B: Tc<sup>R</sup> Str<sup>R</sup>, B1: Tc<sup>S</sup> Str<sup>R</sup>, *S. typhi* HN120: HN120.

### **Determinación del peso molecular mediante electroforesis en campos pulsados (PFGE) y patrones de restricción para el plásmido pHN32.**

Debido a que no conocemos la conformación espacial en la que se encuentren los plásmidos (Dale W. *et al.*, 2004) o si están formando multímeros no es posible determinar su tamaño molecular al comparar estas estructuras con el marcador de peso molecular en el que el DNA se encuentra en forma lineal, es por ello que se

utilizaron enzimas de restricción para estimar el tamaño de los plásmidos y buscar patrones diferenciales entre los plásmidos íntegros y los recombinantes derivados.

Se eligió la enzima *XbaI* para digerir el DNA del plásmido pHN32 ya que su secuencia de reconocimiento no es an común. Al parecer, al ser digerido, el plásmido obtuvo una conformación lineal, al cortar en un único sitio, en ese caso, el peso aproximado del plásmido sería de 70 kb, como lo muestra el marcador de peso molecular (fig. 18).

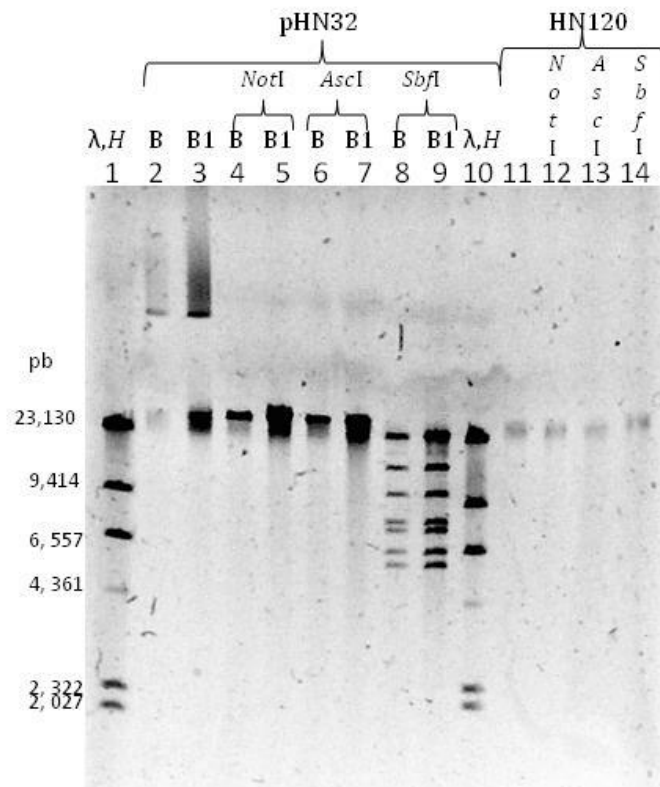


**Fig. 18.** Electroforesis en campos pulsados (*PFGE*) de: 1) pHN32 B, 2) pHN32 B1, 3) M 4) pHN32 B, con *XbaI* 5) pHN32 B1 con *XbaI* 6) HN120. M: marcador (Midrange PFG Marker I), B: Tc<sup>R</sup> Str<sup>R</sup>, B1: Tc<sup>S</sup> Str<sup>R</sup>. *S. typhi* HN120: HN120.

Condiciones de corrida: gel de agarosa 1%, programa: rampa 1-25 seg. por 18 hrs, voltaje: 6 V/cm, ángulo: 120°, temperatura 14° C y velocidad de la bomba 0.75 L/min.

Se siguieron buscando patrones de restricción con diferentes enzimas en geles convencionales para corroborar el tamaño del plásmido pHN32 obtenido mediante

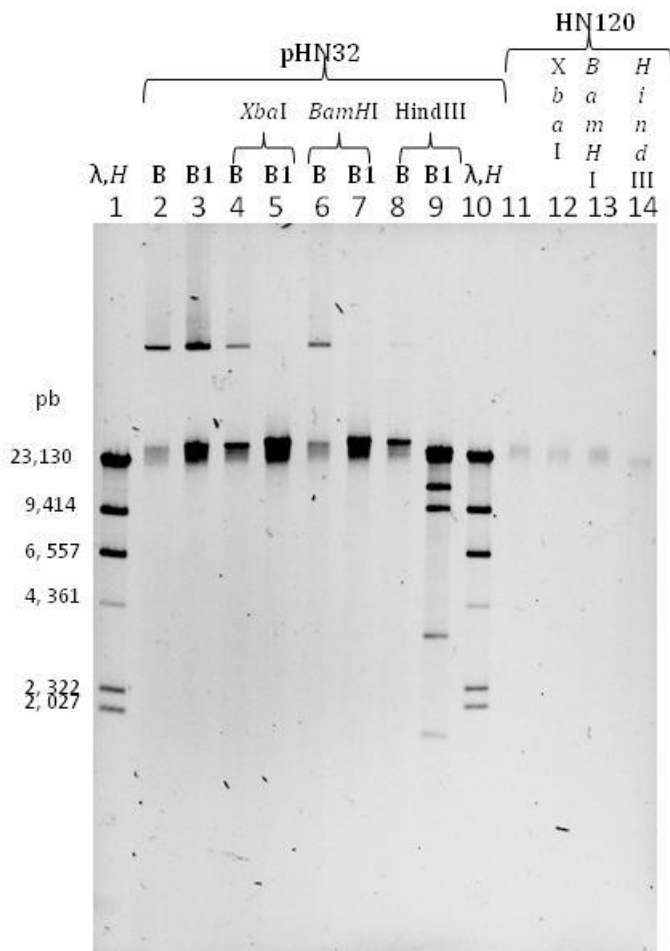
PFGE. La enzima *SbfI* brinda las bandas necesarias para estimar el peso, el cual se aproxima a 77,317 pb (fig. 19.) Cabe destacar que en la restricción con *SbfI* no se observa diferencia en los patrones de bandeo obtenidos entre pHN32 Tc<sup>R</sup> Str<sup>R</sup> y pHN32 Tc<sup>S</sup> Str<sup>R</sup>.



**Fig. 19.** Electroforesis en gel de agarosa de: 1) y 10) marcador λ,H . Extractos de lisis alcalina de *S. typhi* : 2) pHN32 B, 3) pHN32 B1, 4) pHN32 B, *NotI* 5) pHN32 B1, *NotI*, 6) pHN32 B, *AscI* 7) pHN32 B1, *AscI*, 8) pHN32 B, *SbfI*, 9) pHN32 B1, *SbfI*, 11) HN120, 12) HN120 *NotI*, 13) HN120 *AscI*, 14) HN120 *SbfI*. B: Tc<sup>R</sup> Str<sup>R</sup>, B1: Tc<sup>S</sup> Str<sup>R</sup>, λ,H: fago lambda con *HindIII*,

En la figura 20, la enzima útil para el análisis es *HindIII*, que no proporciona un patrón de bandeo en pHN32 Tc<sup>R</sup> Str<sup>R</sup>, pero sí en pHN32 Tc<sup>S</sup> Str<sup>R</sup>, lo cual pueda deberse a un re-arreglos en el plásmido al momento de perder una de las resistencias, proporcionando mayores sitios de corte para la enzima. En cuanto al peso molecular en este caso es estimado utilizando el carril 9, resultando en aproximadamente 71,715 pb.

Gracias a los perfiles de restricción anteriores se pudo obtener un promedio para estimar el tamaño del plásmido pHN32 antes y después del proceso recombinogénico, el cual se aproxima a 73, 659 pb. Este tamaño es coincidente con el estimado por el método de PFGE, y en la tabla 4 se muestra el promedio de ambos métodos; 73, 335 pb. Sin embargo, no se han podido definir zonas que al perderse ocasionen la inestabilidad, por lo que se propone que estas zonas son muy pequeñas. Otra opción es que no se estén perdiendo zonas en la recombinación, si no, simplemente exista una gran reorganización del plásmido, la cual lo desestabilice y vuelva disfuncional el gen que confiere la resistencia a tetraciclina.



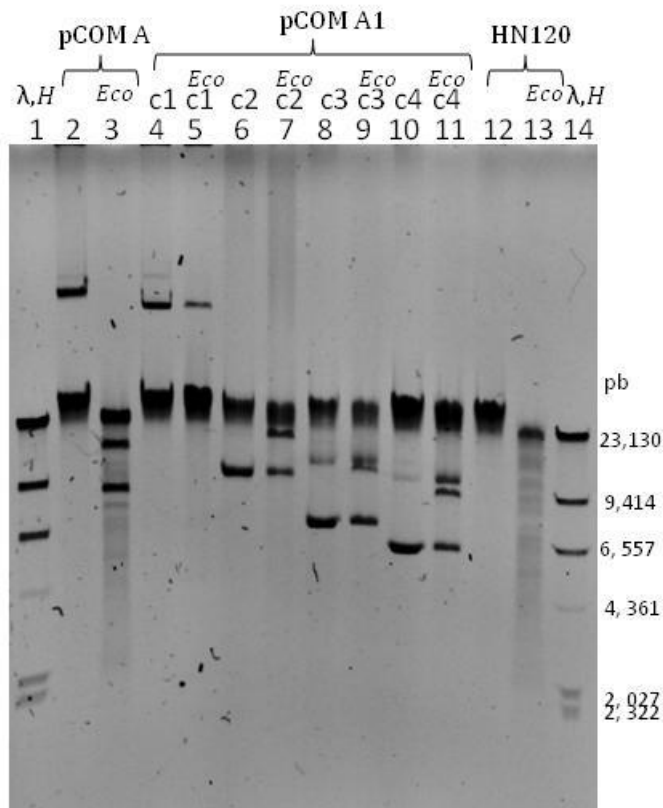
**Fig. 20.** Electroforesis en gel de agarosa de: 1) y 10) marcador  $\lambda, H$ . Extractos de lisis alcalina de *S. typhi* : 2) pHN32 B, 3) pHN32 B1, 4) pHN32 B, *XbaI* 5) pHN32 B1, *XbaI*, 6) pHN32 B, *BamHI* 7) pHN32 B1, *BamHI*, 8) pHN32 B, *HindIII* 9) pHN32 B1, *HindIII*, 11) HN120, 12) HN120 *XbaI*, 13) HN120 *BamHI*, 14) HN120 *HindIII*. B: Tc<sup>R</sup> Str<sup>R</sup>. B1: Tc<sup>S</sup> Str<sup>R</sup>.  $\lambda, H$ : fago lambda con *HindIII*.

**Tabla 4. Pesos calculados del plásmido pHN32 en pares de bases. S: desviación estándar.**

	<i>HindIII</i> (pb)	<i>SbfI</i> (pb)	PFGE (pb)	promedio (pb)	S (pb)
pHN32 Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>		77,317	70,000	73,659	± 5,174
pHN32 Tc <sup>S</sup> , Sm <sup>R</sup>	71,715	77,317	70,000	73,011	± 3,826



## Cortes del plásmido pCOM69 con enzimas de restricción



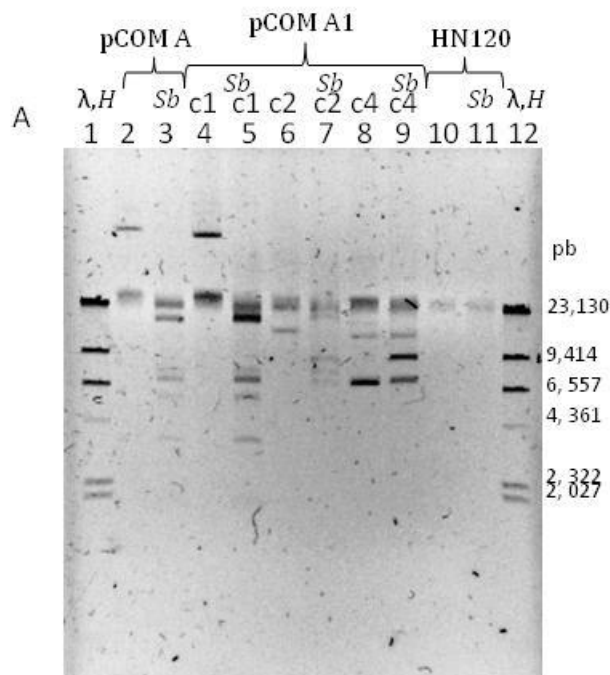
**Fig. 21.** Electroforesis en gel de agarosa de: 1) y 14) marcador  $\lambda, H$ . Extractos de lisis alcalina de *S. typhi*: 2) pCOM A, 3) pCOM A *EcoRI* 4) pCOM A1 (c.1), 5) pCOM A1, (c.1) *EcoRI* 6) pCOM A1, (c.2), 7) pCOM A1 (c.2) *EcoRI*, 8) pCOM A1(c.3), 9) pCOM A1, (c.3) *EcoRI*, 10) pCOM A1 (c.4), 11) pCOM A1(c.4) *EcoRI* 12) HN120, 13) HN120 *EcoRI*. C: clona, A:  $Tp^R$   $Su^R$ ,  $Ap^R$ . A1:  $Tp^S$   $Su^S$ ,  $Ap^R$ .  $\lambda, H$ : fago lambda con *HindIII*. *Eco*: *EcoRI*.

banda que aparece en este último caso se trate de lo mismo que en C2. Por último C4 sin cortar y cortado pesan 7,462 pb, esto al interpretar que las dos bandas superiores que aparecen en el tratado con la enzima sean diferentes formas topológicas del plásmido.

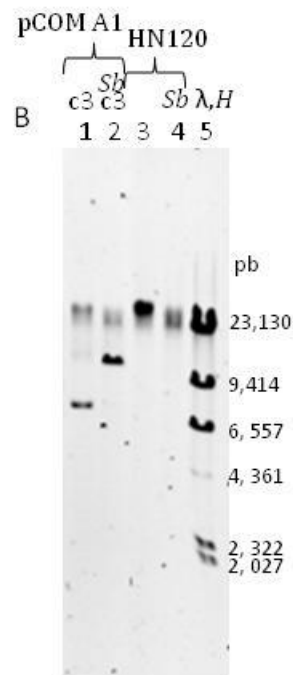
Se digirió pCOM69 y sus recombinantes derivados con la enzima *EcoRI*. Para pCOM69  $Tp^R$   $Su^R$ ,  $Ap^R$  sin cortar se estima un peso de 55,256 pb y al ser cortado un peso de 56,334 pb; ambos pesos están muy aproximados. C1 cortada y sin cortar pesa aproximadamente 50,292 pb. C2 pesa sin enzima 12,845 pb y con enzima 17,036 pb; esto intuyendo

que la banda que aparece en la parte superior se trate de la linearización del plásmido que anteriormente se encontraba en forma más compacta (fig. 21). C3 sin cortar pesa 9,017 y cortado 8,600 pb, intuyendo que la

En la figura 22A se observa a pCOM Tp<sup>R</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup> y diferentes clonas de pCOM Tp<sup>S</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup> tratados con la enzima *SbfI*. Fue posible estimar el peso de pCOM Tp<sup>R</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup> gracias al carril 2, siendo este de aproximadamente 59,562 pb; mismo peso que se estima para C1. Para C2 se estima un peso de 41,116 pb (tomada del carril 7). Y para C4 se calculó un peso de 9,948 pb (carril 9) interpretando que la única banda nueva que aparece después de ser tratado con la enzima se debe a una restricción parcial donde el plásmido se linearizó, la banda superior a esta podría tratarse de un dímero surgido durante la recombinación debido a la falla del sistema de resolución de multímeros (Sengupta y Austin 2011) y la inferior podría tratarse de un topoisómero del plásmido, debido a que ambas se encuentran en C4 sin cortar.



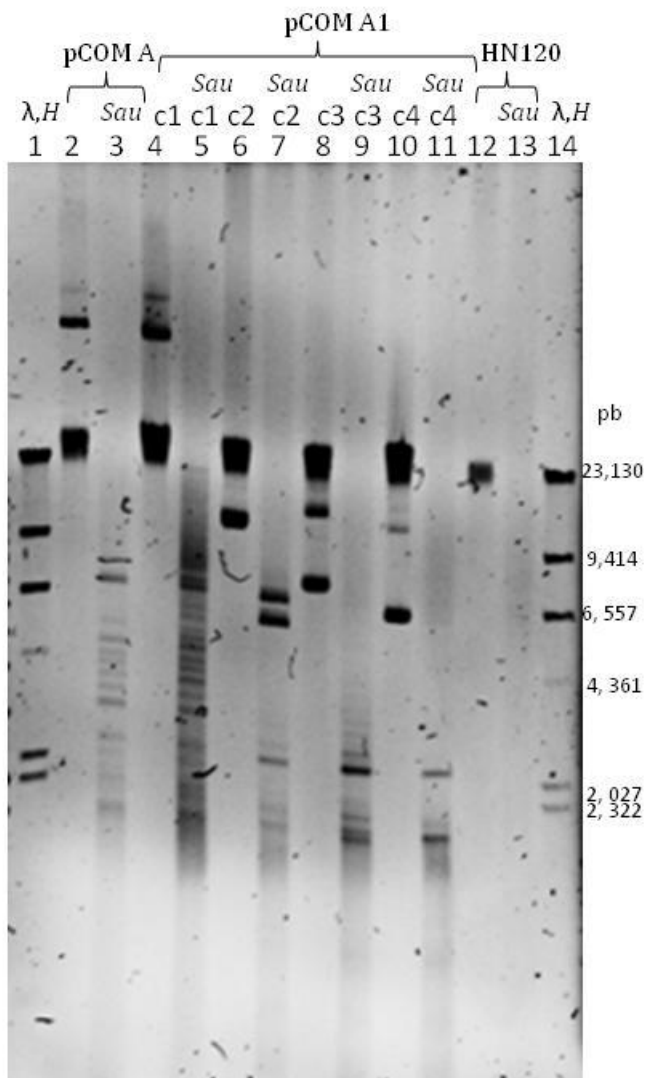
**Fig. 22A.** Electroforesis en gel de agarosa de: 1) y 12) marcador  $\lambda,H$ . Extractos de lisis alcalina de *S. typhi*: 2) pCOM A, 3) pCOM A, *SbfI* 4) pCOM A1, (c.1), 5) pCOM A1, (c.1) *SbfI* 6) pCOM A1, (c.2), 7) pCOM A1, (c.2) *SbfI*, 8) pCOM A1, (c.4), 9) pCOM A1, (c.4) *SbfI*, 10) HN120, 11) HN120 *SbfI*. C:clona, A: Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>, A1:Tp<sup>S</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup>.  $\lambda,H$ : fago lambda con *HindIII*, *Sb*: *SbfI*.



**Fig. 22B.** Electroforesis en gel de agarosa 0.5%: 1) pCOM A1, (c.3), 2) pCOM A1, (c.3) *SbfI* 3) HN120, 4) HN120 *SbfI*., 5) marcador  $\lambda,H$ . C:clona. A1:Tp<sup>S</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup>.  $\lambda,H$ : fago lambda con *HindIII*. *Sb*: *SbfI*.

Respecto a C3 (fig. 22B) probablemente únicamente de linearizó en cuyo caso su peso sería de 14,594 pb.

En cuanto al mapeo de zonas eliminadas, (fig. 22A) es distinguible que entre el plásmido estable y C1 no se observan cambios, entre estos dos y C2 está la pérdida de 2 bandas para C2, una de 3,880 pb y otra de 6,213 pb. Y para C4 desaparecen estas dos mas una de 15, 403.



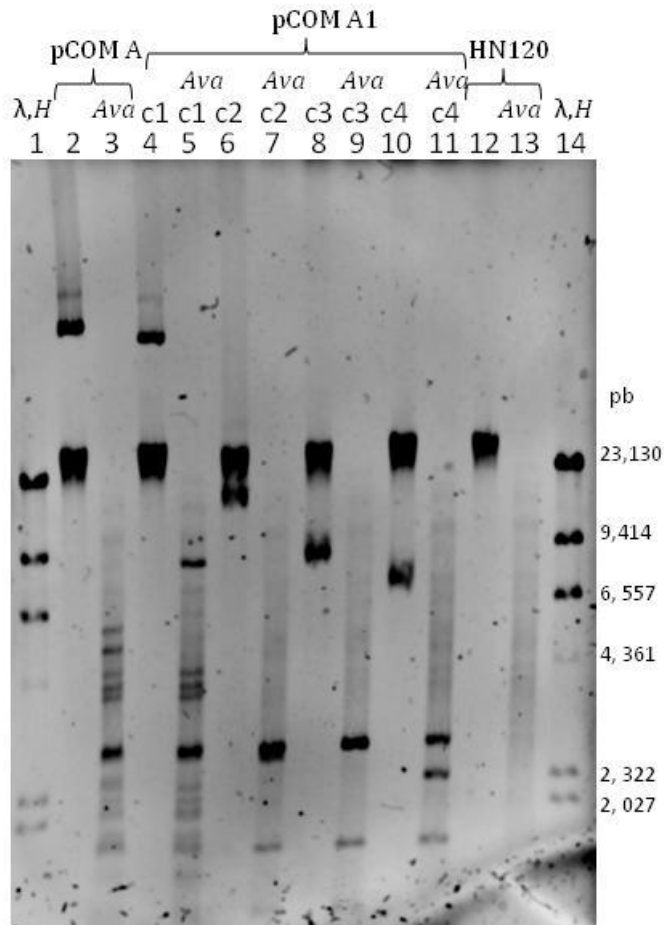
En el caso de las restricciones con *Sau3AI* (fig. 23) es claramente distinguible que en las diferentes clonas se van acumulando las bandas perdidas, estos fragmentos perdidos se muestran más adelante en la tabla 4. Las medidas estimadas por los patrones de bandeo son las siguientes: pCOM69  $Tp^R$   $Su^R$ ,  $Ap^R$  58,025 pb, C1 58,438 pb, C2 29,626 pb, C3 11,377 Pb y C4 5,759 pb.

**Fig. 23.** Electroforesis en gel de agarosa de: 1) y 14) marcador  $\lambda, H$ . Extractos de lisis alcalina de *S. typhi*: 2) pCOM A, 3) pCOM A, *Sau3AI* 4) pCOM A1 (c.1), 5) pCOM  $Tp^S$  A1 (c.1) *Sau3AI* 6) pCOM A1 (c.2), 7) pCOM A1 (c.2) *Sau3AI*, 8) pCOM A1, (c.3), 9) pCOM A1, (c.3) *Sau3AI* 10) pCOM A1, (c.4), 11) pCOM A1, (c.4) *Sau3AI* 12) HN120, 13) HN120 *Sau3AI*. C: clona. A:  $Tp^R$   $Su^R$ ,  $Ap^R$ . A1:  $Tp^S$   $Su^S$ ,  $Ap^R$ .  $\lambda H$ : fago lambda con *HindIII* *Sau*: *Sau3AI*

Al igual que en el caso anterior las restricciones con *AvaII* muestran la pérdida de ciertas bandas (fig. 24). Los tamaños calculados de los plásmidos fueron: pCOM69 Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup> 41,670 pb, C1 39,926 pb, C2 4,714 pb, C3 4,714 pb y C4 7,194 pb.

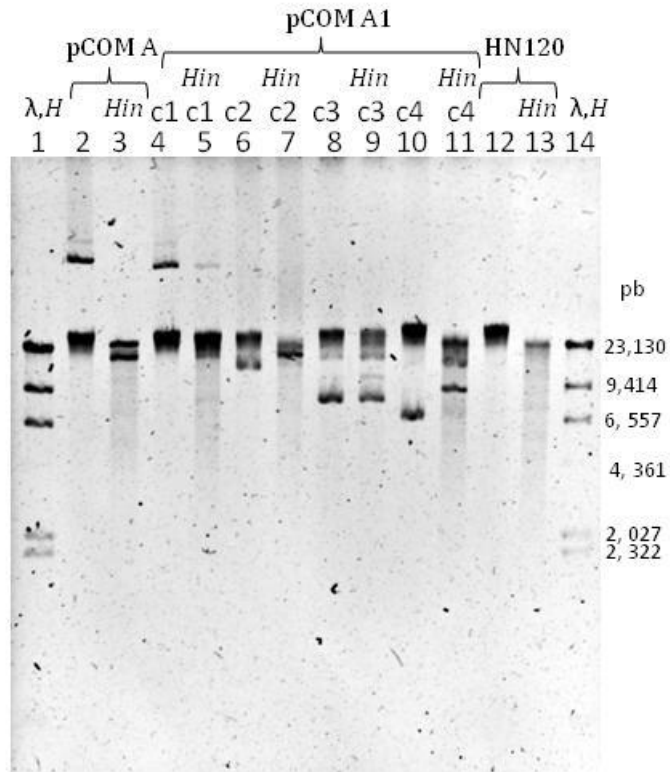
Los fragmentos de pb que se pierden en cada clona se encuentran en la tabla 6 pero en este caso en particular existe una banda en C1 de 11,042 pb aproximadamente que aparece únicamente en esta clona al ser cortada con *AvaII*. Esto puede deberse a un

rearrreglo en el plásmido donde dos bandas, una de 6,075 pb y otra de 7,054 pb presentes en el plásmido íntegro son sustituidas por ésta de mayor tamaño en C1 pero se estarían perdiendo 2,086 pb de pCOM69 Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup> a C1. El fragmento de 2,388 pb presente en c4 y no en c2 y c3 se interpreta como un topoisómero.



**Fig. 24.** Electroforesis en gel de agarosa de: 1) y 14) marcador  $\lambda,H$ . Extractos de lisis alcalina de *S. typhi*: 2) pCOM A, 3) pCOM A, *AvaII* 4) pCOM A1 (c.1), 5) pCOM A1 (c.1) *AvaII* 6) pCOM A1, (c.2), 7) pCOM A1, (c.2) *AvaII*, 8) pCOM A1, (c.3), 9) pCOM A1, (c.3) *AvaII* 10) pCOM A1, (c.4), 11) pCOM A1, (c.4) *AvaII* 12) HN120, 13) HN120 *AvaII*. C: clona. A: Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>. A1: Tp<sup>S</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup>.  $\lambda,H$ : fago lambda con *HindIII*. *Ava*: *AvaII*

La enzima *Hind*III realiza pocos cortes en pCOM69. Los pesos estimados son: pCOM69 Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup> 34,439 pb, C1 33,333 pb, C2 16,147 pb, C3 9,805 pb y C4 11,459 pb. En este caso se interpreta que C3 al ser expuesta a la enzima no hay sitios de corte y en C4 ocurre una linearización del plásmido (fig. 25).



**Fig. 25.** Electroforesis en gel de agarosa de: 1) y 14) marcador λ,H. Extractos de lisis alcalina de *S. typhi* : 2) pCOM A, 3) pCOM A, *Hind*III 4) pCOM A1 (c.1), 5) pCOM A1 (c.1) *Hind*III 6) pCOM A1 (c.2), 7) pCOM A1, (c.2) *Hind*III, 8) pCOM A1, (c.3), 9) pCOM A1, (c.3) *Hind*III 10) pCOM A1, (c.4), 11) pCOM A1, (c.4) *Hind*III 12) HN120, 13) HN120 *Hind*III. C:clona. A: Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>. A1: Tp<sup>S</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup>. λ,H: fago lambda con *Hind*III. *Hin*: *Hind*III

En la tabla 5 se muestra el resumen de los pesos calculados en cada uno de los geles analizados de pCOM69 con las diferentes enzimas, en morado resaltan los pesos resultantes.

**Tabla 5. Pesos calculados del plásmido pCOM69 en pares de bases. C:clona.**

**S: desviación estándar.**

	<i>EcoRI</i> (pb)	<i>SbfI</i> (pb)	<i>Sau 3AI</i> (pb)	<i>Ava II</i> (pb)	<i>Hind III</i> (pb)	promedio (pb)	S (pb)
pCOM69 Tp <sup>R</sup> Su <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	56,334	59,562	58,025	41,670	34,439	50,006	± 11,263
pCOM69 Tp <sup>S</sup> Su <sup>S</sup> , Ap <sup>R</sup> (C1)	50,292	59,562	58,438.00	39,926	33,333	48,310	± 11,486
pCOM69 Tp <sup>S</sup> Su <sup>S</sup> , Ap <sup>R</sup> (C2)	17,036	41,116	29,626	4,714	16,147	21,728	± 13,972
pCOM69 Tp <sup>S</sup> Su <sup>S</sup> , Ap <sup>R</sup> (C3)	8,600	14,593	11,377	4,714	9,805	9,818	± 6,631
pCOM69 Tp <sup>S</sup> Su <sup>S</sup> , Ap <sup>R</sup> (C4)	7,462	9,948	5,759	7,194	11,459	8,364	± 2,294

La tabla 6 muestra un resumen de los fragmentos que se estima, se han eliminado en cada recombinante de acuerdo a la enzima con la que se han tratado. Cabe destacar que conforme las clonas van siendo de menor tamaño los fragmentos eliminados se van acumulando y esto concuerda con el resultado antes observado de que las clonas vayan siendo cada vez más pequeñas.

**Tabla 6. Estimación de fragmentos eliminados en los recombinantes del plásmido pCOM69. (|||: todos los fragmentos del recombinante anterior se repiten, ≡: sin fragmentos eliminados. C:clona).**

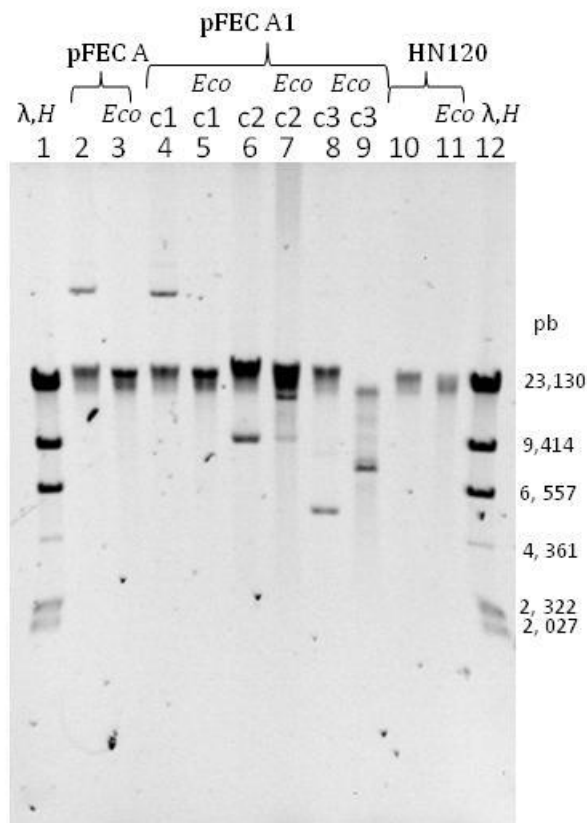
	<i>SbfI</i> (Pb)	<i>Sau 3AI</i> (Pb)	<i>Ava II</i> (Pb)
pCOM69 Tp <sup>S</sup> Su <sup>S</sup> , Ap <sup>R</sup> (C1)	2,086	≡	≡
pCOM69 Tp <sup>S</sup> Su <sup>S</sup> , Ap <sup>R</sup> (C2)		3,966	1,416
	3,880	4,323	1,583
	6,213	4,712	2,057
		5,137	2,216
		5,599	2,388
			4,341
			4,677
			5,232
			6,075
			7,054
pCOM69 Tp <sup>S</sup> Su <sup>S</sup> , Ap <sup>R</sup> (C3)			
	15,403	7,907	
		8,999	
pCOM69 Tp <sup>S</sup> Su <sup>S</sup> , Ap <sup>R</sup> (C4)			
		3,196	1,644
		3,638	

En código de colores también se muestra una propuesta de los fragmentos eliminados que podrían estar coincidiendo entre cada enzima utilizada, (tabla 6) aunque es

importante resaltar que no se logra hacer coincidir todos como en el caso de los 8,999 pb en *Sau3A1*. Sin embargo existen fragmentos de tamaños muy parecidos entre las tres diferentes enzimas como en el caso de los colores amarillo rosa y azul.

### Cortes del plásmido pFEC59 con enzimas de restricción

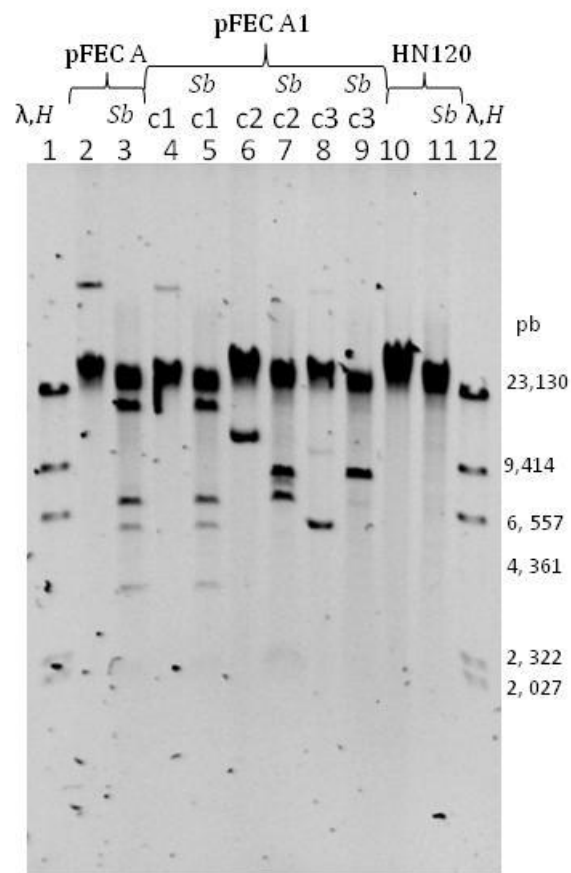
Al cortar el plásmido pFEC59 y sus recombinantes encontrados enzima *EcoRI* se observan pocos patrones de bandeos (fig. 26). Para C2 se estima un peso de 17,828 pb; interpretando que al ser cortado el plásmido tan sólo se linearizó y para C3 se estimó un peso de 8,805 pb.



**Fig. 26.** Electroforesis en gel de agarosa de: 1) y 12) marcador  $\lambda,H$ . Extractos de lisis alcalina de *S. typhi*: 2) pFEC A, 3) pFEC A, *EcoRI* 4) pFEC A1, (c.1), 5) pFEC A1, (c.1) *EcoRI* 6) pFEC A1, (c.2), 7) pFEC A1, (c.2) *EcoRI*, 8) pFEC A1, (c.3), 9) pCOM A1, (c.3) *EcoRI*, 10) HN120, 11) HN120 *EcoRI*. C: clona. A:  $Tp^R Su^R$ ,  $Ap^R$ . A1:  $Tp^S Su^S$ ,  $Ap^R$ .  $\lambda,H$ : fago lambda con *HindIII*. *Eco*: *EcoRI*

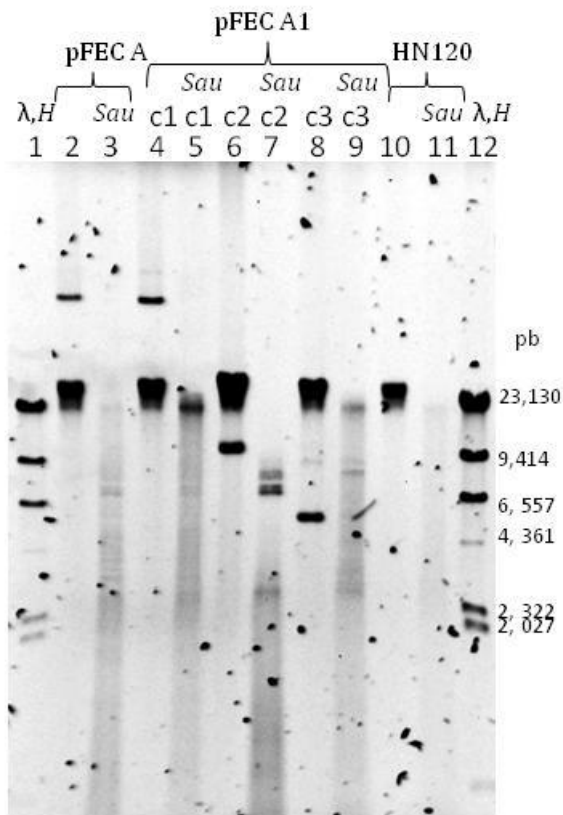
Con *SbfI* los tamaños calculados para los plásmidos fueron: pFEC Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup> y C1 35,680 pb , C2 27,994 pb y C3 9,885 pb (fig. 27)

Con respecto a la pérdida de fragmentos del plásmido íntegro a C2 se observa que se pierden dos fragmentos menores y uno mayor, sin embargo aparecen dos fragmentos nuevos en otra posición, esto podría deberse a un rearrreglo y para el plásmido C3 se hipotetiza una linearización al usar la enzima, e igual que en el caso anterior como no es una banda qué hubo surgido en el plásmido íntegro no se puede interpretar que fragmentos se pierden.



**Fig. 27.** Electroforesis en gel de agarosa de: 1) y 12) marcador  $\lambda,H$ . Extractos de lisis alcalina de *S. typhi* : 2) pFEC A, 3) pFEC A, *SbfI* 4) pFEC A1, (c.1), 5) pFEC A1, (c.1) *SbfI* 6) pFEC A1, (c.2), 7) pFEC A1, (c.2) *SbfI*, 8) pFEC A1, (c.3), 9) pCOM A1, (c.3) *SbfI*, 10) HN120, 11) HN120 *SbfI*. C: clona. A: Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>. A1: Tp<sup>S</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup>.  $\lambda,H$ : fago lambda con *HindIII*. *Sb*: *SbfI*





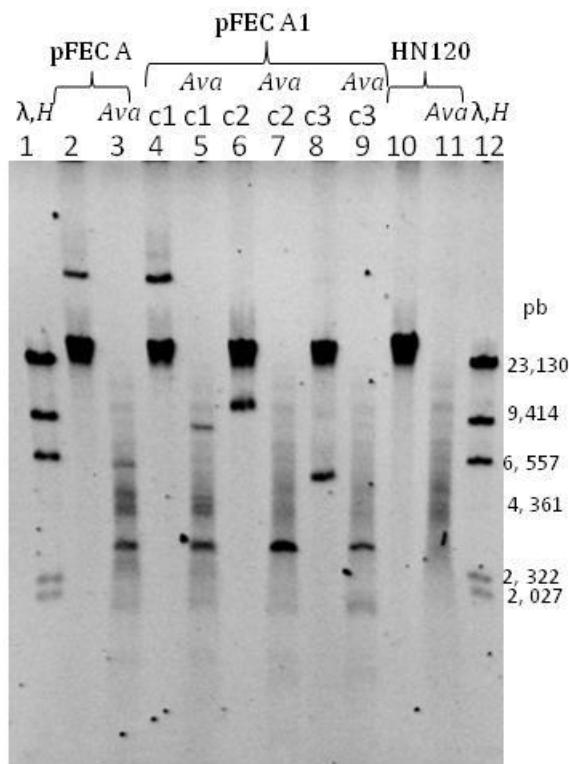
**Fig. 28.** Electroforesis en gel de agarosa de: 1) y 12) marcador  $\lambda, H$ . Extractos de lisis alcalina de *S. typhi*: 2) pFEC A, 3) pFEC A1, *Sau3AI* 4) pFEC A1, (c.1), 5) pFEC A1, (c.1) *Sau3AI* 6) pFEC A1, (c.2), 7) pFEC A1, (c.2) *Sau3AI*, 8) pFEC A1, (c.3), 9) pCOM A1, (c.3) *Sau3AI*, 10) HN120, 11) HN120 *Sau3AI*. C: clona. A:  $Tp^R Su^R, Ap^R$ . A1:  $Tp^S Su^S, Ap^R$ .  $\lambda, H$ : fago lambda con *HindIII*. *Sau*: *Sau3AI*.

El plásmido pFEC59 tratado con la enzima *Sau3A1* únicamente muestra que conforme las clonas van siendo de menor tamaño en los patrones de restricción de cada una van disminuyendo los fragmentos encontrados, indicando que hay sitios que se van perdiendo (fig. 28).

Al usar la enzima *AvaII* es posible distinguir los fragmentos para estimar el tamaño de los plásmidos y la pérdida de algunas bandas (fig. 29). El cálculo de los pesos moleculares para cada plásmido es: pFEC  $Tp^R Su^R, Ap^R$  35,300 pb, C1 23,134 pb, C2 4,832 Pb y C3 4,832 pb.

Al igual que como sucedió con pCOM69 tratado con esta enzima, aparece una banda mayor, en este caso de 9,689 pb en C1 y las mismas dos bandas observadas para pCOM íntegro (ahora una de 4,883 pb y otra de 6,879 pb) se encuentran en pFEC59,

por lo que puede tratarse del mismo rearrreglo mencionado para pCOM69, y se estarían perdiendo aproximadamente 2,072 pb de pFEC59 íntegro a C1.

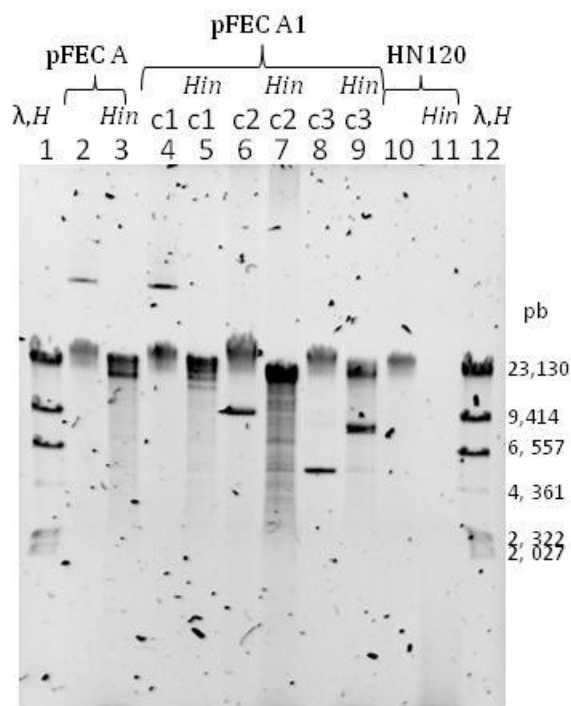


**Fig. 29.** Electroforesis en gel de agarosa de: 1) y 12) marcador  $\lambda, H$ . Extractos de lisis alcalina de *S. typhi*: 2) pFEC A, 3) pFEC A, *AvaII* 4) pFEC A1 (c.1), 5) pFEC A1, (c.1) *AvaII* 6) pFEC A1, (c.2), 7) pFEC A1, (c.2) *AvaII*, 8) pFEC A1, (c.3), 9) pCOM A1, (c.3) *AvaII*, 10) HN120, 11) HN120 *AvaII*. C: clona. A: Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>. A1: Tp<sup>S</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup>.  $\lambda, H$ : fago lambda con *HindIII*. *Ava*: *AvaII*.

La utilización de la enzima *HindIII* proporciona pocas bandas, pero es posible un análisis con los que se estima el peso de los plásmidos (fig. 30): pFEC Tp<sup>R</sup> Su<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup> 48,806 pb, C1 43,398 pb, C2 no es posible estimarlo y C3 7,880 pb.

En este caso en especial para C2 podría estar ocurriendo un rearrreglo en el que surgen muchos sitios de corte para *HindIII* ya que aparecen múltiples bandas al ser tratado con la enzima. En el caso de C3 podría estar ocurriendo una linearización del plásmido

gracias a la enzima. No es posible analizar pérdida de fragmentos en el gel (fig. 30) ya que no hay patrones claros.



**Fig. 30.** Electroforesis en gel de agarosa de: 1) y 14) marcador  $\lambda, H$ . Extractos de lisis alcalina de *S. typhi*: 2) pFEC A, 3) pFEC  $Tp^R Su^R, Ap^R$  A, 4) pFEC A1, (c.1), 5) pFEC A1, (c.1) *HindIII* 6) pFEC A1, (c.2), 7) pFEC A1, (c.2) *HindIII*, 8) pFEC A1, (c.3), 9) pCOM A1, (c.3) *HindIII*, 10) HN120, 11) HN120 *HindIII*. C: clona. A:  $Tp^R Su^R, Ap^R$ . A1:  $Tp^S Su^S, Ap^R$ .  $\lambda, H$ : fago lambda con *HindIII*. *Hin*: *HindIII*

En la tabla 7 se muestra el resumen de los pesos calculados en cada uno de los gels analizados de pFEC59 con las diferentes enzimas, en morado resaltan los pesos resultantes.

**Tabla 7. Pesos calculados del plásmido pFEC59 en pares de bases. C: clona. S: desviación estándar.**

	<i>EcoRI</i> (pb)	<i>SbfI</i> (pb)	<i>HindIII</i> (pb)	<i>AvaII</i> (pb)	promedio (pb)	S
pFEC59 $Tp^R Su^R, Ap^R$		35,680	48,806	34,896	39,794	$\pm 7,814$
pFEC59 $Tp^S Su^S, Ap^R$ (C1)		35,680	43,398	32,823	37,300	$\pm 5,470$
pFEC59 $Tp^S Su^S, Ap^R$ (C2)	17,828	27,994		4,832	16,413	$\pm 16,378$
pFEC59 $Tp^S Su^S, Ap^R$ (C3)	8,805	9,885	7,880	4,832	7,851	$\pm 2,172$

La tabla 8 muestra el resumen de los fragmentos, que se han eliminado en cada clona de pFEC59. En este caso, (debido a los factores mencionados a detalle en el análisis de cada gel) de todas las enzimas utilizadas, la única que aportó información fue *AvaII*, por lo que el resultado puede ser poco robusto.

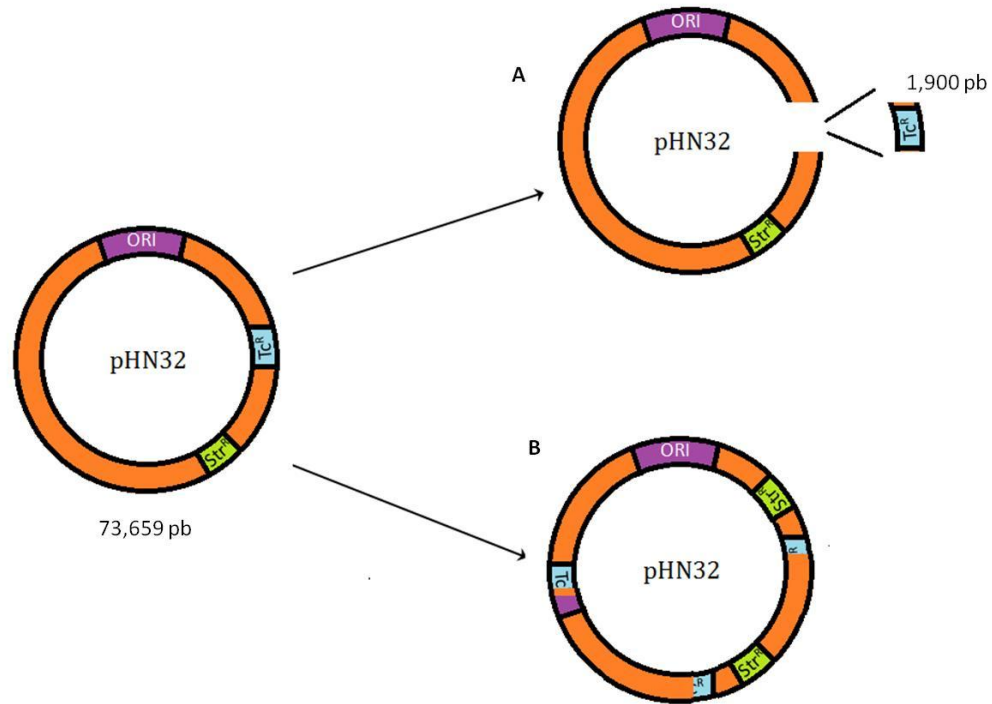
Al igual que en el caso de pCOM69 se observa que conforme se va avanzando en las clonas los fragmentos eliminados se van acumulando y las clonas van siendo cada vez más pequeñas.

**Tabla 8. Estimación de fragmentos eliminados en los recombinantes del plásmido pFEC59. (|||: todos los fragmentos del recombinante anterior se repiten).**

	<i>AvaII</i> (Pb)
pFEC59 TpS SuS, ApR (C1)	2,072
pFEC59 TpS SuS, ApR (C2)	
	2,461
	2,759
	4,114
	4,356
	4,612
	4,883
	6,879
pFEC59 TpS SuS, ApR (C3)	

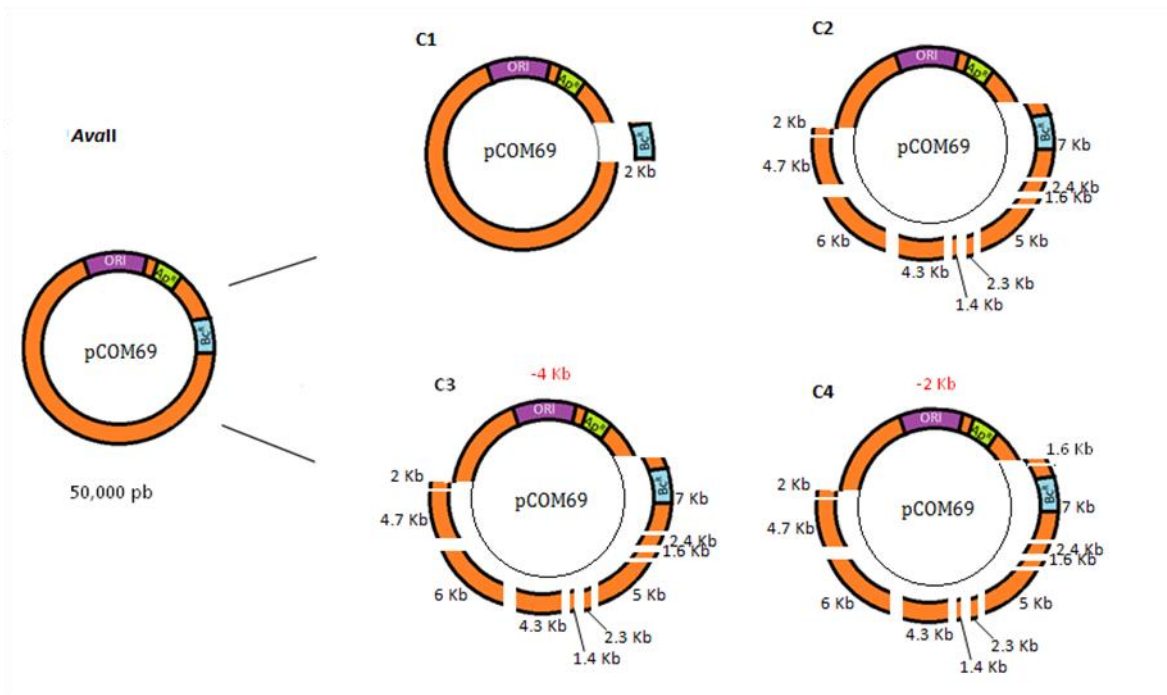
### Esquemas concluyentes

Las dos opciones para la pérdida de la resistencia a Tc en el plásmido pHN32 son: una pequeña *delección* que involucre al gen Tc<sup>R</sup> (fig. 31, A) o múltiples rearrreglos (fig. 31,B)

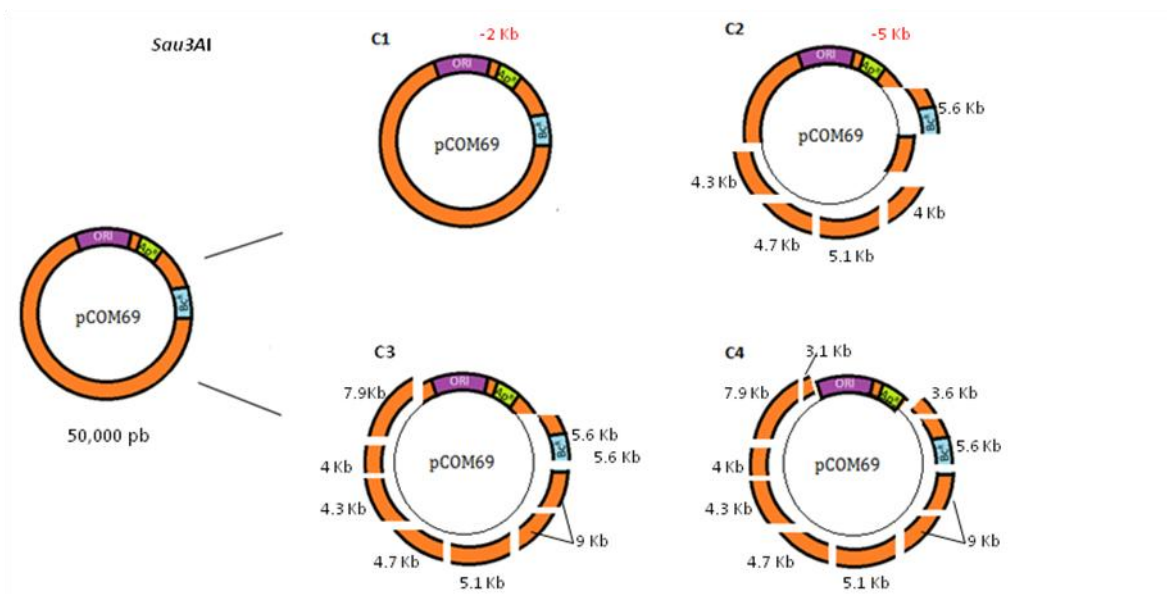


**Fig. 31.** Esquema de los fragmentos modificados para el plásmido pHN32.

Las figuras 32 y 33 esquematizan los segmentos que posiblemente están siendo eliminados del plásmido pCOM69. El esquema está basado en los resultados obtenidos con *Ava*II, y *Sau*3AI respectivamente, sin embargo se toman en cuenta los pesos moleculares promedio obtenidos con todas las enzimas reportadas (tabla 3) y es por ello que en color rojo se resaltan algunos pesos moleculares de fragmentos perdidos hipotéticos, que no estarían siendo observados en el análisis con estas únicas dos enzimas.

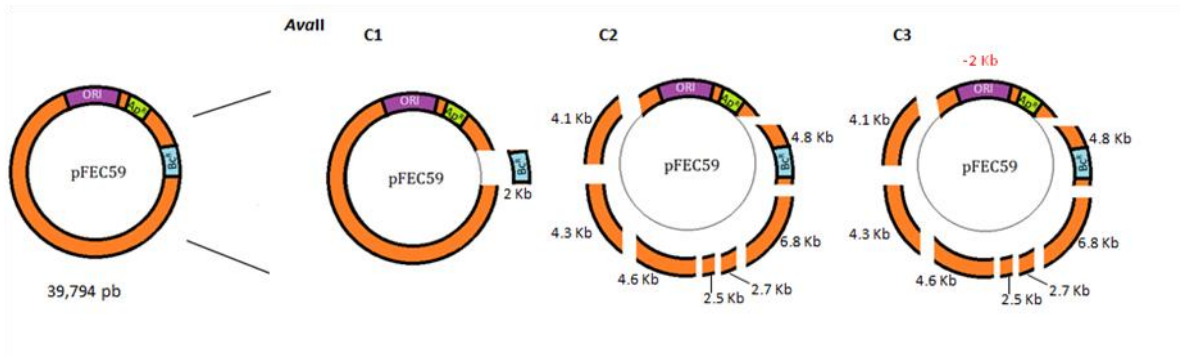


**Fig. 32 .** Esquema de los fragmentos modificados para el plásmido pCOM69 con base en la enzima *AvalI*. C:clona



**Fig. 33.** Esquema de los fragmentos modificados para el plásmido pCOM69 con base en la enzima *Sau3AI*. C:clona.

En la figura 34 se muestran los segmentos que posiblemente están siendo eliminados del plásmido pCOM69. Nuevamente en rojo se observa la hipótesis de un segmento que no estaría siendo observado.



**Fig. 34.** Esquema de los fragmentos modificados para el plásmido pFEC59 con base en la enzima *Ava*II. C:clona

## VIII. CONCLUSIONES

Mediante este estudio fue posible estandarizar las condiciones de la electroforesis tipo Eckhardt para visualizar los plásmidos R. El uso de la electroforesis de campos pulsados y perfiles de restricción permitió una estimación del tamaño de los plásmidos, sin embargo también contribuyó a comprobar que puede realizarse la misma estimación mediante electroforesis convencionales, con lo que se reportó un estimado del peso molecular de cada uno de los plásmidos y sus recombinantes derivados

Al obtener plásmidos recombinantes derivados de cada una de las cepas que contenían a los tres plásmidos mediante la siembra diferencial con antibióticos se encontró un patrón estructural para pHN32 Tc<sup>S</sup> Str<sup>R</sup>, cuatro patrones para pCOM69 Tp<sup>S</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup> y tres patrones para pFEC59 Tp<sup>S</sup> Su<sup>S</sup>, Ap<sup>R</sup>.

El mapeo de los fragmentos que se pierden o modifican en los recombinantes derivados y que por consiguiente ocasionan que se inestabilicen los plásmidos requirió de un complicado análisis; con el cual fue posible observar que los plásmidos estudiados presentan muchos rearrreglos, diferentes formas topológicas y formación de estructuras multiméricas.

Los fenómenos antes mencionados, entre otras cosas, como las posibles restricciones parciales por parte de las enzimas, ocasionan que los patrones de bandeo obtenidos en cada caso puedan ser interpretados de maneras diferentes. Intentando llevar a cabo la interpretación más acertada para cada caso, fue posible hacer una aproximación de los fragmentos buscados para algunos de los plásmidos recombinantes, encontrando que estas regiones son de diferente tamaño en cada plásmido. Sin embargo este análisis no fue suficiente para encontrar regiones homólogas en las diferentes clonas y comprobar que sea un mismo elemento estabilizador el que al perderse esté inestabilizando los plásmidos en *S. typhi* como se comprobó recientemente en el trabajo de Hayashi *et. al.* (2014) donde se encontró una



región de DNA en el plásmido P<sub>yan-1</sub> necesaria para mantener la estabilidad de los plásmidos en la bacteria *Sphingobium yanoikuyae*.

## **IX. PERSPECTIVAS**

Para obtener un mapeo preciso de las zonas modificadas en estos plásmidos y descubrir si existen regiones eliminadas que sean repetitivas en las diferentes clonas encontradas sería necesario llevar a cabo la secuenciación de los plásmidos con sus respectivos recombinantes, perspectiva que está en curso en el laboratorio y que el presente trabajo forma parte de la exploración preliminar para lograr.

## X. REFERENCIAS

Abby S., V Daubin., 2007. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. Trends Microbiol. 3, 135-41.

Amabile Cuevas, C.F., Chicurel, M.E., 1992. Bacterial plasmids and gene flux. Cell 70, 189-199.

Anderson, E.S., Threlfall, E.J., Carr, J.M., Mc Connell, M.M., Smith, H.R., 1977. Clonal distribution of resistance plasmid carrying *Salmonella typhimurium*, mainly in the Middle East. J. Hyg. (Lond) 79, 425- 448.

Ang JY, Ezike E, Asmar BI., 2004. Antibacterial resistance. Indian J Pediat. 71, 229-239.

Bergstrom, C.T., Lipsitch, M., Levin, B.R., 2000. Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids. Genetics 155, 1505- 1519

Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo , F. J., Tauxe, R., Swaminathan, B., 2000. Salmonella nomenclature. Journal of Clinical Microbiology. 38 (7), 2465-2467.

Brown DJ., Munro DS., Platt DJ., 1986. Recognition of the cryptic plasmid, pSLT, by restriction fingerprinting and a study of its incidence in Scottish Salmonella isolates. J. Hyg. Camb. 97, 193-197.

Darling AE., I Miklós., MA Ragan., 2008. Dynamics of Genome Rearrangement in Bacterial Populations. Infect Immun. 73(9), 5568-77.

Datta, N., Hedges, R.W., 1971. Compatibility groups among fi-R factors. Nature (London) 234, 222-223.

Datta, N., Hughes, V.M., 1983. Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature* 306, 616 – 617.

Davis B. M., Waldor MK., 2013. Horizontal gene transfer: linking sex and cell fate. *Curr Biol.*23(3):118-119.

Dutta C., Pan A., 2002. Horizontal gene transfer and bacterial diversity. *J Biosci.* 27(1 Suppl 1):27-33.

Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1, 584-588.

Edwards JS., Betts L., Frazier ML., Pollet RM., Kwong SM., Walton WG., Ballentine WK 3rd., Huang JJ., Habibi S., Del Campo M., Meier JL., Dervan PB., Firth N., Redinbo MR., 2013. Molecular basis of antibiotic multiresistance transfer in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 2013

Espuny M.R., Ollero F. J., Bellogin R.A., Ruiz-Sainz J.E., Perez-Silva J., 1987. Transfer of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* symbiotic plasmid pGtr5a to a strain of *Rhizobium* sp. that nodulates on *Hedysarum coronarium*. *Journal of Applied Bacteriology.* 63, 13-20.

Falkow, S., 1975. The sex factor, F, and temperate phages. Infectious multiple drug resistance, J.R. Lagnado (editor). Pion Limited, Londres, p. 8.

Finch, M.J., Franco, A., Gotuzzo E, E., et al., 1992. Plasmids in *Salmonella typhi* in Lima, Peru 1987–1988: epidemiology and lack of association with severity of illness or clinical complications. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 390–396.

Frances G O'Brien., Edet E Udo., Warren B Grubb., 2007. Contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis of *Staphylococcus aureus*. Nature Protocols. 1, 3028 - 3033

Francia, M.V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M.P., Latorre, A., Drainas, C., de la Cruz, F.A., 2004. Classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. FEMS Microbiol Rev. 28, 79– 100.

French GL., 2005. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. Adv Drug Deliv Rev. 57, 1514-1527.

Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A., 2005 Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. Nat Rev Microbiol. 3, 722-732.

Garcia-Vallve S., Romeu A., Palau J., 2000. Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes. Genome Res. 10:1719 - 1725.

Gerdes, K., and E. G. Wagner., 2007. RNA antitoxins. Curr. Opin. Microbiol. 10, 117– 124.

Gerdes, K., J. Moller-Jensen, and R. Bugge Jensen., 2000. Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. Mol. Microbiol. 37, 455– 466.

Haack KR., Roth JR., 1995. Recombination between chromosomal IS200 elements supports frequent duplication formation in *Salmonella typhimurium*. Genetics. 141,(4) 1245-52.

Hacker J., JB Kaper., 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu Rev Microbiol. 54, 641–679

Hayashi H, Kurusu Y., 2014. Analysis of a DNA region from low-copy-number plasmid pYAN-1 of *Sphingobium yanoikuyae* responsible for plasmid stability. *Biosci Biotechnol Biochem.* 78, 510-5

Hedges R.W., Datta, N., 1971.  $\phi$ - R-factors giving chloramphenicol resistance. *Nature New Biol.* 234, 220–221.

Hayes, F., 2003. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301, 1496–1499.

Jeremy W., Dale Simon., F Park., 2004. *Molecular genetics of bacteria*, ed. John Wiley & Sons, Ltd, 4<sup>o</sup> edición, Inglaterra.

Juhas M., van der Meer JR., Gaillard M., Harding RM., Hood DW., Crook DW., 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 33, 376- 393.

Kado C. I. Sau and Liu S. T., 1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *J. of Bacterology.* 145, 1365-1373.

Koneman, A., et al., 1999. *Diagnostico microbiológico*, 5<sup>a</sup> ed. Medica panamericana 1432 pp.

Koonin EV., YI Wolf., 2008. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res.* 36, 6688-719. Review.

Lawrence JG, H Ochman., 1998. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 9413-7.

Lawrence JG., 2001. Catalyzing bacterial speciation: correlating lateral transfer with genetic headroom. *Syst. Biol.* 50, 479- 496

Ling, J.M., Hui. Y.W., Cheng, A.F., French, G.L., 1992. Development of trimethoprim-resistance in *Salmonella typhi* during therapy. Pathology. 24, 190–193.

Liu S. L. y Sanderson K. L., 1995. Rearrangements in the genome of the bacterium *Salmonella typhi*. PNAS. 92, (4) 1018-1022.

Lodish, H., Berck., Matsudaira., Kaise., Krieger., Scott., Zipurski y Darnell., 2005. Biología celular y molecular, 5ªed. Médica Panamericana, 973 pp.

Martínez-Suárez, J.V., Martínez, J.L., Lopez M.J., Pérez-Díaz, J.C, Baquero, F., Meseguer, M., Linares, J., 1987. Acquisition of antibiotic resistance plasmids in vivo by extraintestinal *Salmonella* spp. J. Antimicrob. Chemother. 20,452–453.

Mendoza-Medellín, A., Ríos-Chávez, I., Amaro-Robles, D., 1993. Behavior of *Escherichia coli* R factors in *Salmonella typhi*. Rev. Lat. Am. Microbiol., 35, 77–85.

Mendoza-Medellín, A., Camacho-Carranza, R., Curiel-Quesada, E., 2004. *E. coli* R-factors unstable in *S. typhi* become deleted before being segregated in this host. Plasmid. 51, 75–86

Mendoza-Medellín, A., Camacho-Carranza, R., Curiel-Quesada, E., 2012. Instability of *Escherichia coli* R-factors in *Salmonella enterica serovar typhi* involves formation of recombinant composite plasmid structures. Plasmid 68, 125-32

Mira A, L Klasson, SG Andersson., 2002. Microbial genome evolution: sources of variability. Curr Opin Microbiol. 5 (5), 506-512.

Murray, B.E., Levine, M.M., Cordano, A.M., et al., 1985. Survey of plasmids in *Salmonella typhi* from Chile and Thailand. J. Infect. Dis. 151, 551–555.

Neu Harold C. 1992. The Crisis in Antibiotic Resistance. SCIENCE. 257, 1064-1073.

Novick, R.P., R.C. Clowes, S.N., Cohen, R., Curtís 3°, N. Datta, & S. Falkow, 1976. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bact. Rev.*, 40, 168-176.

Novick, R.P., 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51, 381– 395.

Ochman H, JG Lawrence., EA Groisman., 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* 405(6784):299-304.

Ochman H, NA Moran., 2001. Genes lost and genes found: the molecular evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* 292, 1096-1098

Phipps, M., Pang, T., Koh, C.L., Puthuchery, S., 1991. Plasmid incidence rate and conjugative chloramphenicol and tetracycline resistance plasmids in Malaysian isolates of *Salmonella typhi*. *Microbiol. Immunol.* 35, 157–161.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA., 2004. *Microbiología.* 5a ed. Madrid: McGraw Hill Interamericana.

Richards, H., Datta, N., 1982. Plasmids and transposons acquired by *Salmonella typhi* in man. *Plasmid* 8, 9–10.

Schwalbe, R.S., Hoge, C.W., Morris, J.G., O Hanlon, P.N., Crawford, R.A., Gilligan, P.H., 1990. In vivo selection for transmissible drug resistance in *Salmonella typhi* during antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34,161–163.

Sengupta M., Austin S., 2011. Minireview: Prevalence and Significance of Plasmid Maintenance Functions in the Virulence Plasmids of Pathogenic Bacteria. *Infection and Immunity.* 7, 2502–2509

Sambrook J.F. and Russell D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3e Edition, Volume 1, 2 & 3, 2100 pp.

Stanley R., Maloy, Valley., Joseph Stewart., Ronald K. Taylor., 1996. Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria: A Laboratory Manual, CSHL,EUA.

Sun S, Ke R., Hughes D., Nilsson M., Andersson DI., 2012. Genome-wide detection of spontaneous chromosomal rearrangements in bacteria. . PLoS One7(8). e42639

Tam CK., Hackett J., Morris C., 2005. Rate of inversion of the *Salmonella enterica* *shufflon* regulates expression of invertible DNA. Infect Immun. 73(9), 5568-77.

Tillier ERM., Collins RA., 2000. Genome rearrangement by replication directed translocation. Nat Genet. 26, 184-186.

PLoS Genet. 2011 Jan 27;7(1):e1001284. doi: 10.1371/journal.pgen.1001284.

Treangen TJ, Rocha EP. 2011 Horizontal transfer, not duplication, drives the expansion of protein families in prokaryotes. PLoS Genet. 27,7(1):e1001284.

Waters, V.L., 1999. Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. Front. Biosci. 4, 416– 439

Wheatcroft, R., McRae D. G., Miller R.W., 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. Molecular plant-microbe interactions. 3, (1) 9-17.



## XI. ANEXOS

1.

$x = N^{\circ}$  de bacterias al tiempo 0

$y = N^{\circ}$  de bacterias al tiempo t

t = tiempo en crecimiento exponencial

Al tiempo 0  $y = x$

Después de: 1 generación  $y = x.2$

2 generaciones  $y = (x.2) 2 = 2^2 x$

3 generaciones  $y = (2.2 x) 2 = 2^3 x$

n generaciones  $y = 2^n x$

n = (número de generaciones)

Resolviendo la ecuación anterior para n se tiene:

$$\log y = \log x + n \log 2 \rightarrow n = \frac{\log y - \log x}{\log 2}$$

2. Gráficas que representan el número de generaciones necesarias en *S. typhi* para encontrar individuos en los que se haya perdido una de las dos resistencias codificadas en cada plásmido.

