

2 Ej.
5

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Caracterización de Cepas Auxótrofas
para cisteína de Salmonella Typhi**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO EN
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A

GLORIA SOBERON CHAVEZ

MÉXICO, D. F.

1980



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.

I N D I C E:

	Pág.
Introducción.....	1
Material y Métodos.....	7
Resultados.....	13
Discusión.....	24
Tablas y Figuras.....	31
Bibliografía.....	45
Agradecimientos.....	48

INTRODUCCION

La fiebre tifoidea es un padecimiento endémico en México, alcanza tasas de mortalidad de 3 en 100,000 habitantes por lo que constituye un problema de salud pública, además ha habido brotes epidémicos en los que la mortalidad alcanza 6 por --- 100,000 habitantes (1).

En el año de 1972 se registró un brote epidémico en el valle de México, que afectó parte de los estados de México, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala, además del Distrito Federal, en el que se detectaron de 10,000 a 15,000 casos confirmados (2) y la mortalidad llegó a ser hasta de 9.7 por 100,000 habitantes en los meses de abril y mayo (3). Se reportó también que los casos atendidos en ese tiempo fueron más graves y se presentaron -- complicaciones más frecuentemente (4).

Se encontró que el 92% de las cepas de Salmonella typhi aisladas en este período eran resistentes a altas concentraciones de cloranfenicol (hasta 1mg/ml), que es el agente antimicrobiano de elección en casos de fiebre tifoidea; con este resultado se cambió el tratamiento administrado por ampicilina o por una mezcla de sulfametoxazol trimetroprima (5) y se llegó a reducir la mortalidad a valores normales inmediatamente.

Esta fue la primera vez que se aislaron cepas de Salmonella typhi resistentes a cloranfenicol en nuestro país, y como era de esperarse, su impacto en la frecuencia y severidad de la -

fiebre tifoidea fue notorio. Al estudiar las cepas se encontró que no solo eran resistentes a este antibiótico sino también a estreptomycin (sm), tetracilina (tc) sulfonamidas (su) y que estas resistencias estaban codificadas en un plásmido - conjugativo (6, 7, 8) que pertenecía al grupo de compatibilidad H.

En India, vietnam y Tailandia se aislaron cepas de S. typhi - con este mismo patrón de resistencias y se determinó que tenían un plásmido del mismo grupo de compatibilidad (9). Sin embargo, este plásmido no es el mismo que se encuentra en otras enterobacterias cm^R , sm^R , tc^R , su^R , como es el caso de la cepa - de Shigella dysenteriae que provocó una pandemia en Centro -- América en los años de 1969 a 1970 (10) que era portadora de un plásmido del grupo de compatibilidad O (6).

El fagotipo de la gran mayoría de las cepas multiresistentes - aislados durante 1972 era un tipo V1 degradado similar al fago tipo A. Esto contrasta con lo encontrado en el único reporte - previo de fagotipos de cepas mexicanas, hecho en 1956, (11) en el que el mayor porcentaje lo ocupaba el fagotipo E1.

Con estos antecedentes se inició una investigación en el laboratorio con el propósito de seguir a lo largo del tiempo éstas y otras características de las cepas de Salmonella typhi aisladas en México y de detectar cualquier cambio que pudiera repercutir en la frecuencia de la fiebre tifoidea en nuestro país.

En el año 1978, Alfaro y Martuscelli (12) reportaron algunos

resultados de esta investigación entre los que destacan los siguientes:

- a) En el año 1975 todavía el 21% de las cepas estudiadas - eran resistentes a cm, sm, tc y su.
- b) El fagotipo Vi degradado característico de la cepa epidémica, continuaba siendo el más abundante hasta el año -- 1975, y el segundo en frecuencia era el E1.
- c) De 947 cepas aisladas entre 1973 y 1976 el 92% eran auxótrofas para cisteína y el resto tenían un requerimiento adicional o distinto que no fue determinado.

Los datos de auxotrofia son los primeros reportados para cepas mexicanas y no existe un estudio epidemiológico de este tipo - de marcadores en cepas de S. typhi aisladas en otros países. - La auxotrofia de las cepas usadas en algunos trabajos con esta enterobacteria (13, 16) es $\text{Trp}^- \text{Cis}^-$ y no se ha utilizado - una cepa protótrofa.

Este trabajo tiene como objetivo estudiar algunos aspectos de la auxotrofia para cisteína de Salmonella typhi para tratar - de determinar por qué es tan abundante.

Una de las interpretaciones que se había dado al hallazgo de - la abundancia de cepas Cis^- era que esto requerimiento era un marcador cromosómico de la cepa epidémica (12). Esto sería - importante pues apoyaría la idea de que en la epidemia de 1972 la bacteria en sí era diferente. (Y que este brote pudiera no

solo haber sido ocasionado por la resistencia a cloranfenicol que presentaron las cepas.) Este problema se abordó experimentalmente.

Por otro lado se trató de determinar si la auxotrofia podía - darle una ventaja selectiva a S. typhi, este enfoque podría - dar algunos datos del mecanismo molecular de la patogenia de esta bacteria del que se sabe muy poco.

No existe un reporte de la frecuencia de cepas cis^- en otros países, sin embargo por comunicación personal sabemos que la frecuencia de esta auxotrofia encontrada en México no es la regla y que en Chile por ejemplo predominan las cepas auxotrofas para triptofano.

Con respecto a la relación entre auxotrofia y patogenicidad de Salmonella typhi existen datos (13, 14, 15) de que mutantes aisladas en el laboratorio que tienen un bloqueo en la - síntesis de purinas o del ácido para-aminobenzoico son mucho menos virulentas que la cepa de la que provienen que era originalmente Tf_p^- . La virulencia fue evaluada usando como - sistema experimental el ratón, (especie que no es huésped de la bacteria) inyectándoles intraperitonealmente una dosis de varios millones de bacterias y cuantificando el número de ratones muertos.

Se demostró que la disminución en virulencia de estas mutantes se debía a que tanto las purinas como el ácido para aminoben-

zoico que se encuentra en el fluido peritoneal eran limitantes para el crecimiento de las bacterias. En el caso de las mutantes que requerían ácido para-aminobenzoico se encontró que su virulencia aumentaba al incluir este metabolito en la dieta de los ratones.

En este trabajo también se aislaron mutantes para otros 20 - metabolitos y se encontró que esta nueva auxotrofia no afectaba su virulencia, entre los mutantes aislados había auxotrofos para cisteína y para cisteína o metionina.

La disminución en la virulencia de las mutantes que requieren purinas también se encontró al estudiar una cepa aislada de un portador sano (16). La virulencia fue evaluada también en ratones.

Con estos datos se puede entender por qué no se aíslan cepas que presentan algunas auxotrofias de enfermos de fiebre tifoidea, pero no explican por qué son tan frecuentes otras, como la de cisteína, en el caso de México, y no se aíslan auxotrofos para otros aminoácidos que parecieran no modificar la virulencia de esta enterobacteria en el ratón.

Las hipótesis alternativas que explican la abundancia de las cepas Cis^- en México, son, que este marcador esté relacionado con un aumento de virulencia de Salmonella typhi o que hubiera predominado por un fenómeno de deriva génica (17).

Si la auxotrofia para cisteína le diera alguna ventaja a la -

cepa que la presentara se esperaría que aislamientos clínicos independientes tuvieran mutaciones independientes, ya que cada vez que apareciera una cepa con este fenotipo se seleccionaría, sin importar cual es la mutación que la produjo.

Si la mutación fuera neutral y hubiera permanecido en el ambiente porque en el proceso de transmisión de la enfermedad - solo una fracción de las cepas existentes infectara a alguna - persona, y azarosamente, entre estas cepas predominara una - Cis^- , se predeciría que todos los auxotrofos para cisteína pro - vendrían de una sola cepa y por lo tanto tendrían la misma - mutación.

El enfoque experimental usado en este trabajo es el de caracterizar el fenotipo Cis^- de algunas cepas de Salmonella typhi aisladas en la ciudad de México entre los años 1972 y 1979 y tratar de determinar si todos ellos tienen la misma mutación.

La vía de biosíntesis de cisteína ha sido muy bien estudiada en otras enterobacterias, como Escherichia coli y Salmonella typhimurium (18), y gran parte de la caracterización de la - auxotrofia para cisteína de S. typhi realizada en este trabajo se hizo basada en esos resultados. La figura 1 es un esquema de la síntesis de este aminoácido en esas enterobacterias a - partir de sulfato y de la síntesis de metionina, teniendo como precursor a la cisteína.

MATERIAL Y METODOS

MEDIOS DE CULTIVO Y MATERIALES:

Los medios de cultivo usados son: medio Luria (triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%); medio mínimo M9 (MM) (NH_4Cl 0.1%, KH_2PO_4 0.3% Na_2HPO_4 0.6%, NaCl 0.5%, MgSO_4 0.025% y dextrosa 0.2%), en algunos experimentos se substituyó la dextrosa por lactosa a la misma concentración (MMLac); medio mínimo sin azufre (sf) según Qureshi et al (19). La concentración de agar usada para solidificar estos medios es de 2%.

La concentración de cisteína (cis) metionina (met) y tiosulfato de sodio (tio) en los medios mínimos fue 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la de sulfato de sodio ($\text{SO}_4^{=}$) sulfito de sodio ($\text{SO}_3^{=}$) y sulfuro de sodio ($\text{S}^{=}$) 10 μg de azufre/ml.

Su usó una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de los siguientes antibióticos: estreptomina (sm), ácido nalidixico, (nal), espectinomina (spc) y rifampicina (rif); de ampicilina (amp) se usó - 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

La L-metionina (^{35}S) >500 Ci/mmol fue obtenida de New England - Nuclear, Boston, Mass.

ORGANISMOS:

En la tabla I se describen las cepas de Salmonella typhi utilizadas; todas las cepas aisladas en México provienen del Hospital de

Infectología de la Raza del IMSS con la excepción de la cepa -- JM3664 que fue aislada en el Hospital Infantil de México. La cepa 26 es una cepa de referencia del esquema de fagotipia de - S. typhi y la cepa Ty 2 es la utilizada en México para produ-- cir la vacuna contra la fiebre tifoidea.

En la tabla II se muestran las cepas de Escherichia coli utili-- zados en el presente trabajo.

En algunos experimentos se usaron mutantes espontáneas resis-- tentes a algunos antibióticos, esto se especifica al hablar de esos experimentos.

Las cepas auxotrofas de cisteína y treonina fueron aisladas por mutagénesis de la cepa JM 3746 con etil metano sulfonato según - el método de Lin et al (20).

Las cepas GS1, GS2 y GS3 (Tabla VII), provienen de una mutágene-- sis y fueron seleccionados en MM cis, las cepas GS4 y GS5 provie-- nen de otro tratamiento y se seleccionaron en MMTio.

La cepa GS7 fue construída a partir de la cruce de la cepa GS6 - (Tabla 1) y la AG1 (Tabla II), se seleccionó como Thr⁻ Nal^r, y Rif^r y [R17^S] según el método descrito por Miller (21) para cons-- truir una copa Hfr Hayes de E. Coli.

La cepa ZA-1 fue construída y caracterizada por Alicia González y María José Gama, se construyó a partir de la cepa JM1382, por in

tegración de un F Km (22) y dona a una cepa multimarcada de E. Coli, con una frecuencia decreciente los marcadores ilv, -- argG, his.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO:

La temperatura usada para el crecimiento de todas las bacterias fue 37°C.

El crecimiento en medio mínimo sólido se probó estriando o poniendo una gota de un cultivo proveniente de medio Luria, centrifugado y resuspendido en sales M9 e incubando por 48 hrs. Las cajas de Luria sólido se incubaron de 12 a 18 hrs.

El crecimiento en medio líquido se cuantificó por el aumento en densidad óptica de los cultivos agitados a 200 revoluciones por minuto; se midió en un colorímetro Baush and Lomb a 550 nm o en un colorímetro de Klett-Sumerson con filtro rojo. La cepa a probar se creció toda la noche en Luria sin agitación y se diluyó 1:20 en el mismo medio o en alguno de los medios mínimos después de haber sido lavado con sales M9.

Se determinó que los aislamientos clínicos que se habían reportado (12) como auxotrofos de cisteína podrían crecer además, en metionina y tiosulfato de sodio, estriando 30 cepas de S. typhi, -- aisladas de 1972 a 1976, en medio mínimo M9 adicionando de diferentes metabolitos según el método de Holiday (23) para identificar mutantes.

El crecimiento de las cepas en anaerobiosis se determinó inoculando cepas en medio mínimo sólido e incubándolas por 48 horas dentro de una jarra de anaerobiosis Gas Pak que genera una atmósfera de 95% H₂, 5% CO₂.

CONJUGACION BACTERIANA:

La conjugación se realizó en medio Luria, mezclando un cultivo en fase de crecimiento exponencial de la cepa receptora, con una densidad óptica de 0.2 a 550 nm, con un cultivo estacionario de la bacteria F⁺, diluido a la misma densidad óptica con una relación de volumen 1:10 donadora: receptora.

La mezcla de conjugación se dejó a 37 °C sin agitación por tiempo variable, según el experimento.

ANÁLISIS DE COMPLEMENTACION:

La complementación de las auxotrofias para cisteína de S.typhi por el F'595, derivado de la cepa JM245 (Tabla II) se determinó a partir de colonias capaces de crecer en MMcis lac, obtenidas después de una conjugación de 3 hrs. de la cepa JM245 con cada una de las cepas a analizar. El crecimiento en medio mínimo líquido con lactosa se comparó después con el obtenido en el mismo medio más cisteína.

La complementación con el F'41 proveniente de la cepa KLF 41/JC1553 (Tabla II) se analizó con algunas cepas que no se habían complementado por el F'595, para ello se utilizaron mutan-

tes resistentes a nal y spc de las cepas de S. typhi. La conjugación se dejó toda la noche, después de lo que se diluyó el cultivo con Luria a una densidad óptica de 0.2 a 550 nm, se -- puso en agitación a 37°C en presencia de spc y amp por dos horas y media, tiempo en el que el cultivo tenía aproximadamente .1 - de densidad óptica a 550 nm. Se lavaron las células se resus-- pendieron en Luria-nal y se dejaron crecer toda la noche en agi-- tación; se obtuvieron colonias aisladas de este cultivo y las -- que eran resistentes a nal y sensibles a spc y al bacteriofago - R17 (F+ específico) se consideró que tenían el F'41. Se probó - el crecimiento en sólido de S. typhi con el F'41 en MM y MM cis.

Marcaje de las células y medición de la radioactividad:

Se creció la cepa Stlla hasta 0.2 de densidad óptica a 550 nm en MM met, se lavaron y resuspendieron las células en la mitad de - volumen de medio sf adicionado de 10 ug/ml de metionina y de 10 uCi/ml de L-metionina (³⁵S). Se dejó agitando 4 horas a 37°C y se cosecharon las células por filtración lavándolas en el filtro con sf.

Se contaron las muestras en un contador de centelleo líquido -- Packard tri-carb AAA en el canal para ³²P.

ANALISIS DE AMINOACIDOS.

Las células fueron lisadas por el método descrito por Espin et - al (24) para Neurospora crassa. El patrón de aminoácidos fue - obtenido usando un analizador de aminoácidos, Aminco Ratio Fluo-

rometer,

Ya que se utilizó un programa de este aparato que no detecta a la cisteína, la muestra se trató con ácido fórmico según el método de Moore (25) para convertir la cisteína en ácido cisteico como controles se usaron soluciones de cisteína y metionina de 200 µg/ml tratadas de igual manera que el extracto de la cepa - Stlla y se vió el patrón de fluorescencia obtenido en el analizador corriendo cada una por separado,

Cuando se corrió el extracto de la cepa Stlla, el amortiguador contenía ácido cisteico y norleucina, que corren a 4 y 58 minutos respectivamente; al correr los patrones de cisteína y metionina se omitió el ácido cisteico en el amortiguador.

Para cuantificar la radioactividad presente en cada aminoácido de la muestra, se colectaron fracciones cada 30 segundos, después de pasarla por el analizador.

RESULTADOS

Fenotipo Cym:

Al estudiar 30 cepas de S. typhi que habían sido reportadas como Cis-(12), se encontró que crecían además de en cisteína, en metionina y tiosulfato de sodio, este fenotipo se denominó Cym.

En la tabla III y figura 2 se pueden ver algunas cepas con este fenotipo, es notorio que todas ellas tienen un bloqueo parcial, ya que son capaces de crecer en MM, aunque con un tiempo de duplicación mayor que en MMcis, MM met o MMtio.

En esta misma tabla se muestra otro tipo de auxótrofo para cisteína (cepa JM3745), que sólo crece en este aminoácido, que presenta una fase lag de 12 horas y tiene un bloqueo total (fenotipo Cis⁻) y una cepa protótrofa (JM3746).

Tanto en Salmonella typhimurium como en Escherichia coli se han aislado mutantes Cym⁻ (18); en el caso de S. typhimurium (19) se reportó que este fenotipo era producido por una mutación regulatoria que afectaba alguna actividad enzimática de la biosíntesis de cisteína, y que mapeaba en el gene que codificaba para esa enzima, esto se probó para los genes cis, C,D,H,I,J,A y G (Fig. 1); se postuló que estas mutantes son capaces de sintetizar cisteína a partir de SO₄= en presencia de metionina.

Es posible obtener mutantes Cym⁻ termosensibles para S. typhimurium y para E. coli se han obtenido cepas con este fenotipo por inserción del transposón Tn5 (26).

El fenotipo Cym⁻ es el más frecuente entre los aislamientos clínicos realizados entre 1972 y 1978 (Tabla IV), en 1979 aparece el fenotipo Cis- y las cepas protótrofas, siendo las últimas las más abundantes, para 1980 vuelven a predominar las Cym⁻ y no se detectan protótrofas. Con respecto a las copas que no presentaban ninguno de los fenotipos mencionados, se determinó que, de 12 cepas estudiadas, 7 eran auxotrofas para triptofano y el resto además de Trp⁻ eran Cym⁻.

Se investigó la frecuencia del marcador Cym⁻ entre 24 cepas de referencia del esquema de fagotipia para S. typhi y se encontró que sólo la cepa 26 (Tabla III) lo presentaba, del resto 16 eran Trp⁻ y 7 además de triptofano requerían cisteína. Este hallazgo contrasta con lo observado entre los aislamientos clínicos realizados en los últimos ocho años en la Ciudad de México (Tabla IV).

En la Tabla III y en la figura 2 se muestra el crecimiento de la cepa JM 3664 en MM, MMCis, MMet y MMtio, esta cepa fue aislada en el Hospital Infantil de la Ciudad de México en el año de 1960 y presenta un fenotipo Cym⁻. Este dato demuestra que el fenotipo Cym⁻ no es característico de la cepa que causó la epidemia en 1972.

Dentro de las cepas Cym⁻ de S. typhi se encuentran prácticamente todos los fagotipos y las hay tanto sensibles como resistentes a antibióticos, esto podría usarse como un criterio para decir que son cepas de origen distinto, sin embargo se sabe que -

el fagotipo puede ser modificado por elementos extracromosómicos (27) y que las resistencias a antibióticos son codificadas por un plasmido (12) por lo que, para probar que las cepas son distintas, se tiene que demostrar que las mutaciones que producen el fenotipo Cym^- son diferentes.

Bloqueo de las Mutantes Cym^- :

Para averiguar si, al igual que en otras enterobacterias, estas mutantes presentaban un bloqueo en la síntesis de cisteína, se probó el crecimiento de las cepas Cym^- de S.typhi en algunos precursores de este aminoácido.

Se utilizó $SO_4^=$, $SO_3^=$ y $S^=$ pues se sabe que el tiosulfato de sodio se metaboliza en E. coli y S.typhimurium (28) para producir $SO_3^=$ y $S^=$, y como todas las cepas de S.typhi Cym^- crecen en tiosulfato de sodio, lo más probable es que tuvieran un bloqueo en la conversión de $SO_4^=$ a $S^=$ (Fig.1).

Se estiraron todas las cepas en medio sf sólido adicionado de $SO_4^=$, $SO_3^=$ y $S^=$ y a las 48 horas las cepas sólo habían crecido en sf $S^=$.

En la tabla V se muestra el tiempo de duplicación de las cepas en sf líquido adicionado con $SO_4^=$, $SO_3^=$ o $S^=$, se puede ver que todas ellas crecen más rápido en $S^=$, aunque en los otros dos medios también crecen.

Es notorio que todas las cepas crecen mejor en sf $SO_4^=$ que en -

MM que tiene la misma fuente de azufre (Tabla III y tabla V), - esto no es producido por diferencias en la concentración de sulfato pues es aproximadamente 100 veces mayor en MM que en H_2SO_4^m .

El resultado obtenido sugiere que todas las mutantes Cym^- estudiadas tienen un bloqueo en la conversión de SO_3^- a S^- ; este paso se realiza por la enzima sulfito reductasa en E. coli y -- S. typhimurium, y los genes cis I, J y G codifican para los tres polipéptidos que la forman (fig. 1).

Tipo de Mutación:

La determinación de la frecuencia de reversión espontánea de las cepas Cym^- pudiera ser importante por dos razones: primero, el que tuvieran una deleción podría explicar que fueran tan abundantes, pues no revertirían (29) y aunque en otras enterobacterias no se han reportado cepas Cym^- por deleción parecería posible obtenerlos, pues, como se dijo, existen mutantes por inserción de Tn5 con este fenotipo. Por otro lado se pudiera usar como criterio para distinguir las cepas Cym^- , aunque todas presenten el mismo bloqueo, si unas revirtieran y otras no.

En la tabla VI se muestran las frecuencias de reversión espontánea de algunas cepas Cym^- de S. typhi, los resultados son comparables con que dichas cepas tengan una mutación puntual.

Obtención de Mutantes Cis⁻:

Ya que todas las cepas Cym^- estudiadas eran indistinguibles, por

los criterios mencionados, existía la posibilidad de que en -- Salmonella typhi, contrariamente a lo que sucede en otras en terobacterias, este fenotipo sólo pudiera ser producido en mutantes en que se afecta el paso de SO_3^- a S^- .

Por otro lado, como todos los aislamientos clínicos que crecían en tiosulfato de sodio lo hacían también en metionina, existía la posibilidad de que el metabolismo de cisteína y metionina -- fuera diferente al de E. coli y S. typhimurium en las que la cisteína es precursor de metionina (fig. 1), y que en ambos aminoácidos fueran interconvertibles a nivel de un producto de la degradación de tiosulfato.

Para probar esta posibilidad se aislaron mutantes auxótrofos para cisteína a partir de la cepa JM3746.

En la Tabla VII se muestra el tiempo de duplicación de cinco -- auxótrofos de cisteína aislados de la cepa JM3746, en varios medios de cultivo.

Las cepas GS1 y GS4 son Cym^- , la cepa GS1 se distingue de los -- aislamientos clínicos en que no crece en MM.

Las mutantes GS2 y GS3 crecen en cisteína y tiosulfato de sodio, pero no en metionina y es claro que, por lo menos una de ellas (GS2), tiene un crecimiento óptimo en sulfuro, lo que sugiere que tenga la misma actividad enzimática deficiente que las cepas estudiadas.

La cepa GS5 tiene un fenotipo similar a los aislamientos clínicos, pero el bloqueo que presenta parece encontrarse anterior a la formación de sulfito, ya que tiene un crecimiento igual en sulfuro y sulfito y menor en sulfato.

También estos mutantes crecen mejor en SO_4^- que en MM.

El fenotipo de estas cepas sugiere que la vía de asimilación de azufre sea similar en Salmonella typhi y en Salmonella typhimurium ya que en ambas especies es posible aislar mutantes que - creciendo en tiosulfato, en sulfuro y en cisteína, no crezcan en metionina.

Por otra parte también se puede concluir que el fenotipo Cym^- en S. typhi es producto de una mutación regulatoria que puede - afectar la actividad de por lo menos dos diferentes enzimas de la biosíntesis de cisteína, y que esta deficiencia enzimática es de alguna manera suplida en presencia de metionina.

Conversión de Metionina en Cisteína;

Para determinar si las mutantes Cym^- utilizan la metionina como precursor de cisteína, o si son capaces de crecer en metionina porque su presencia les permite usar el sulfato del medio para sintetizar cisteína por la vía normal, se marcó por 4 horas una de estas mutantes (Stlla) con metionina (^{35}S) y se buscó radioactividad en cisteína.

En la figura 3 se ven los patrones de florescencia obtenidos - en un analizador de aminoácidos de (a) la cepa Stlla, (b) un patrón de cisteína y (c) un patrón de metionina, después de haber sido tratados con ácido fórmico.

La radiactividad detectada en el extracto de la cepa Stlla se grafica en la figura 3a, en la que es aparente que no sólo los productos derivados de metionina están marcados, sino también los producidos por la oxidación de cisteína.

Este resultado demuestra que las mutantes Cym^- de S. typhi -- usan la metionina como precursor de cisteína, contrariamente a lo reportado por Qureshi et al (19) para Salmonella typhimurium.

Análisis de Complementación.

Los aislamientos clínicos Cym^- de S. typhi no habían podido ser distinguidos y parecían tener el mismo bloqueo al nivel de la enzima sulfito reductasa. Como ya se había mencionado en otras enterobacterias esta enzima está constituida por tres polipeptidos codificados por los genes *cis* I, J y G, los primeros - dos genes mapean juntos en el minuto 59 del mapa de E. coli (30) y a 90 minutos en el de S. typhimurium (31); el gene *cis* G - se encuentra en el minuto 73 del cromosoma de E. coli y en - el 109 del de S. typhimurium.

El que estos genes estén tan distantes da la posibilidad de separar los aislamientos clínicos en por lo menos dos grupos,

según si su mutación se encuentra en cis I, J o en cis G.

El primer criterio que se usó para ver en que polipéptido eran mutantes las cepas Cym^- de S.typhi fue el análisis de complementación; se utilizaron dos F' derivados de E. coli con este motivo; uno de ellos, el F'595 es un F' lac que lleva los genes Cis I y J además de los cis C, D y H. El otro, el F'41 lleva la región del cromosoma de E. coli que va del gene argG al gene asd; en este intervalo se encuentran, además de otros, los genes de las proteínas ribosomales y el gene cis G, no lleva ningún otro de los genes cis reportados en E. coli.

En la Tabla VIII se muestran los resultados de la complementación de las cepas Cym^- y de las mutantes obtenidas a partir de la cepa JM3746, con el F'595. Con este criterio sí es posible distinguir dos tipos de cepas Cym^- , aquellas que se complementan, que incluyen aislamientos realizados de 1973 a 1978 en la ciudad de México, y la cepa Ty2; y los que no crecen en presencia del plásmido como los aislados en 1960, 1972, una más de 1973 y la cepa 26.

Con respecto a las mutantes la única que se complementa es la GS5, esta cepa crecía en SO_3^- y S^- por lo que su deficiencia debe de estar en alguno de los genes cis C, D o H.

Se trató de probar que las mutantes que no se complementaban por el F'595 tenía una mutación en el gene cis G utilizando el F'41, se hizo este análisis con las cepas 26 y JM2053 y se encontró que las dos eran capaces de crecer en MM en pre-

sencia de este plásmido.

Mapeo de las Mutaciones Cym^- :

Para mapear las mutaciones Cym^- se utilizaron dos estrategias; en la primera se usó una Hfr, GS7, derivada de la cepa prototrofa JM3746 que lleva la región del cromosoma de E. coli que va del gene treo a gene rif., y entre estos marcadores tiene insertado un factor F. Con esta cepa se hizo una cinética de aparición de recombinantes Cis^+ cruzándola por algunas de las cepas Cym^- ; cuando se utilizaron receptoras capaces de complementar con el F'595, como la cepa Stlla o la JM3618 (fig.4) - se encontró que la frecuencia aumenta a partir de los 30 minutos de conjugación. Al usar como receptoras cepas no complementadas con el F'595, no se detectó aumento en la frecuencia aún - después de 40 minutos de conjugación, esto se probó con las -- cepas JM3664, JM1382 y GS4.

Las cruzas no se dejaron por más de 40 min. ya que la cepa Hfr tiene integrado un fago alrededor del minuto 45 que provoca - que la frecuencia de recombinantes Cis^+ disminuya hasta ser - nula alrededor del minuto 60 de iniciada la conjugación.

Este resultado es un criterio más para decir que por lo menos existen dos tipos de mutantes Cym^- entre los aislamientos clínicos y coloca a los dos loci mutados con por lo menos diez minutos de distancia.

Si se considera que el origen de donación de la cepa GS7 corres

ponde al origen de donación de una Hfr, Hayes, que en E. coli es el minuto 0, la posición de los genes cis I, J (o) en ---- Salmonella typhi estaría aproximadamente 30 minutos más cercanos a este origen.

El segundo criterio para mapear las mutantes fue utilizar la - Hfr ZAl que es derivada de la cepa Cym⁻ JM1382, para determinar la frecuencia de recombinantes Cis+, cruzándola con otras cepas Cym⁻ por dos horas y media (Tabla IX).

Se puede ver que entre los aislamientos clínicos la frecuencia de recombinantes (# de colonias en el t²# de colonias a 2.5 horas de conjugación / # de receptoras en la cruz) es menor entre las cepas no complementadas por el F'595 que entre las que sí se complementan; sin embargo no se puede determinar la distancia de la mutación de la donadora con respecto a la mutación de las distintas receptoras porque como no son isogénicas estas últimas, la eficiencia para conjugarse puede variar y esto afectar la frecuencia con que se obtienen colonias Cis+. Lo que sí se puede concluir es que todas, incluyendo las cepas del mismo grupo de complementación, tienen mutaciones diferentes a la de la cepa JM1382.

Este resultado, junto con los datos de complementación, demuestra por lo menos que hay tres cepas Cym⁻ con orígenes diferentes.

Fenotipo de las Cepas Cym⁻ en Anaerobiosis:

Se probó el crecimiento en anerobiosis de la protótrofa JM3746 y de las cepas Cym⁻ JM3618 y JM 1382, la primera de ellas complementada por el F'595 y la segunda no, y se encontró que -- las tres son capaces de crecer tanto en MMcis, MMmet como en MM.

Con respecto a los mutantes obtenidos en el laboratorio, las cepas GS1, GS3 y GS5 crecen en MM en anaerobiosis y la GS2 y GS4 no lo hacen.

En S. typhimurium existe un reporte (32) de que mutantes en algunos genes cis (cis I, J y B) son capaces de crecer en anaerobiosis en medio mínimo sin cisteína, pero no se ha dilucidado el mecanismo por el que se revierte fenotípicamente este requerimiento; en ese trabajo se encontró que los mutantes en cis G requiere cis en anaerobiosis, esto contradice lo encontrado con los aislamientos clínicos Cym⁻, pues uno de ellos parece ser mutante en este gene (JM1382)

DISCUSION

En este trabajo se encontró que los aislamientos clínicos de Salmonella typhi realizados entre 1960 y 1978 que tienen un fenotipo Cym^- se caracterizan por su capacidad de crecer en metionina tan bien como en cisteína, y tener un bloqueo parcial en la conversión de SO_3^- a S^- producido por una mutación reversible y que aunque las cepas estudiadas comparten estas características, se pueden distinguir tres tipos de bacterias con mutaciones diferentes. Esto sugiere fuertemente que presentar dicho fenotipo representa una ventaja selectiva para esta enterobacteria; esta ventaja no es absoluta ya que se pueden aislar cepas con otras auxotrofias, principalmente para triptofano.

Por otro lado, es interesante que solamente se hayan aislado cepas protótrofas durante 1979, y que para 1980 ya no se hayan detectado (Tabla IV); esta situación pudiera interpretarse como que, aunque este tipo de bacterias sean patógenas, compitan desfavorablemente con las distintas auxotrofas, Cym^- , Cis^- , o Trp^- .

Es difícil explicar el que una cepa que haya perdido una función tenga una ventaja sobre la cepa original, sin embargo, se puede pensar que el crecimiento de la mutante en presencia de su requerimiento sea más rápido que el de la cepa protótrofa; en E. coli existen datos de que cuando se crecen mezclados en un quemostado en presencia de histidina, una cepa protótrofa y una

mutante his⁻ derivada de ella, la auxotrofa sobrecrece a la otra (33), este resultado apoyaría la idea expuesta para -- explicar el que ser auxotrofa sea ventajoso en ciertas condiciones.

Suponiendo que la ventaja selectiva para las auxotrofas esté dada porque crecen más rápido que una cepa prototrofa en presencia de su requerimiento es difícil entender porque solo se aíslan cepas Cis⁻, Cym⁻ o Trp⁻ de enfermos de tifoidea. El tracto digestivo no es un medio constante, su composición de pende de la dieta del organismo y de los períodos de ingesta, sin embargo no parece probable que los únicos aminoácidos no limitantes para el crecimiento de las bacterias fueran cisteína, metionina y triptofano; por otra parte una vez habiendo cruzado las bacterias la barrera intestinal, los únicos metabolitos que parecieran no estar en suficiente concentración para sostener el crecimiento de una auxotrofa son las purinas y el ácido para-amino benzoico (13,14,15). Tomando esto en cuenta, se tiene que postular que las auxotrofas que se aíslan de enfermos de tifoidea tienen otras características que las hace predominar sobre otro tipo de mutantes.

En el caso de las Cym⁻ esta característica pudiera ser su capacidad de crecer en anaerobiosis sin su requerimiento. Estas mutantes dentro del tracto digestivo donde la concentración - de oxígeno es muy baja y donde su requerimiento pudiera no estar presente durante ciertos períodos, se comportarían como - protótrofas y una vez habiendo penetrado al organismo donde el

nivel de cisteína es constante y, al parecer, suficiente para su crecimiento, podrían llegar a sobrecrecer a una protótrofa.

El que la ventaja selectiva que da el fenotipo Cym^- a S.typhi fuera producto, por lo menos en parte, de la capacidad de crecer en anaerobiosis sin cisteína o metionina, podría explicar por qué, aún cuando se pueda producir este fenotipo por más de un tipo de bloqueo en la síntesis de cisteína, todos los aislamientos clínicos son muy homogéneos en cuanto a la deficiencia enzimática que presentan pues todas las bacterias que no pudieran crecer en anaerobiosis, aunque tuvieran este fenotipo, se seleccionarían en contra.

El único hospedero de Salmonella typhi es el hombre, por lo que los estudios de patogenicidad, de esta bacteria son muy difíciles de realizar. Como se mencionó se ha usado al ratón como sistema experimental para este fin, este modelo es muy poco sensible, se necesitan alrededor de 100 veces más bacterias para matar a un ratón que para que un hombre contraiga la fiebre tifoidea, y no se sabe si el mecanismo por el que se muere un ratón sea el mismo que por el que un hombre se enferma, por esto solo se obtienen respuestas gruesas usando este sistema.

Si se contara con un sistema experimental adecuado para medir la virulencia de S. typhi, se podría probar la hipótesis de que las cepas Cym^- tienen una ventaja selectiva por ser auxo-

trofas y por poder crecer sin su requerimiento en anaerobiosis. Se podrían hacer experimentos de competencia usando -- dos cepas Cym⁻, sólo una de las cuales creciera en anaerobiosis en M.M.; se inocularía al organismo usado como modelo experimental por vía intraperitoneal y por vía oral y se predeciría que solo al inocular por vía oral la cepa que creciera en anaerobiosis en M.M. sobre crecería a la otra. Usando este mismo esquema experimental se podrían comparar una cepa prototrofa y las dos Cym⁻.

Un aspecto que no se explica con la hipótesis expuesta es que la mayor parte de los aislamientos clínicos sean Cym⁻ y no Cis⁻ pues tanto en S. Typhi (ver crecimiento en Anaerobiosis de las cepas Cym⁻) como en S. typhimurium (32) existen mutantes Cis⁻ que crecen en anaerobiosis y en las dos especies se obtienen -- más frecuentemente mutantes Cis⁻ que Cym⁻ (13). Por otra parte dentro del organismo parece haber tanto cisteína como metionina suficiente para sostener el crecimiento de una auxotrofa (14), esto se mostró en ratones y la única posibilidad que le daría una ventaja a los Cym⁻ sobre las Cis⁻ sería que la cisteína dentro del cuerpo humano fuera limitante para el crecimiento de las bacterias y la metionina no.

Otra manera de explicar que ciertas auxotrofas tengan una ventaja selectiva sería que al acumular un producto por no poderlo -- metabolizar, éste se utilizara más eficientemente para algún -- paso importante dentro del ciclo de vida de la bacteria en su -- hospedero, podría ser usado, por ejemplo, en la producción de --

toxinas o de moléculas que atraparan fierro (34) que es uno de los alimentos limitantes para el crecimiento bacteriano dentro del cuerpo humano (35). Si esta hipótesis fuera cierta la presión selectiva contra las bacterias que no tuvieran esa mutación sería muy grande y se esperaría que si varias - mutaciones fueran ventajosas el tipo de bacterias más frecuentemente aislados sería el que presentara todas ellas.

Los aislamientos clínicos Cis^- detectados en 1979 y 1980 - (Tabla IV) no fueron estudiados detalladamente y no se sabe todavía si se presentó un fenómeno similar al de las cepas - protótrofas y tiendan a desaparecer o si puedan competir favorablemente con los Cym^- y Trp^- . Por los datos obtenidos con la cepa JM3745, que presenta este fenotipo, solo se puede concluir que presentan un bloqueo en la conversión de S^- a cisteína y que presentan una mutación revertible que mapea separada a la de los dos grupos de cepas Cym (Tablas VI y IX).

Como se mencionó al principio de este trabajo la frecuencia del fenotipo Cym^- parece no ser la misma en todas partes y - en otros lugares parecer ser que las Trp^- son más abundantes (Ver resultados con cepas de fagotipo), esta diferencia pudiera estar dada por un fenómeno de deriva genica, siendo los dos fenotipos igual de ventajosos, o podría ser que la ventaja - selectiva que estas auxotrofías le confieren a S. typhi estuviera influenciada por factores ambientales como la alimentación de las personas. Estas dos posibilidades son difíciles de - descartar y se tendría que contar con un sistema experimental

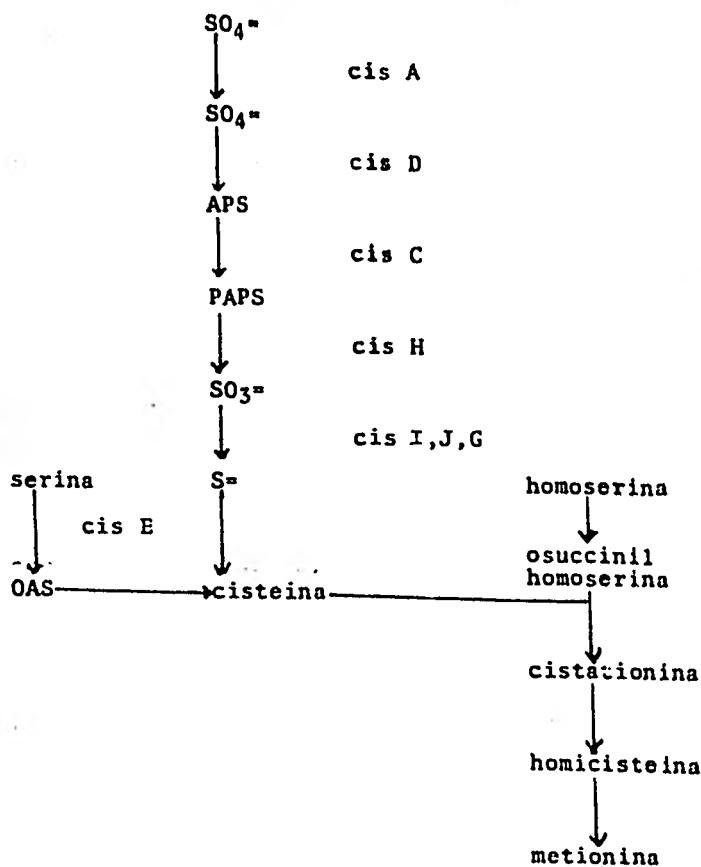
modelo que simulara la fiebre tifoidea para poder hacerlo.

Independientemente del papel que tengan las mutantes Cym^- en la patogenicidad de S. typhi constituyen un problema biológico interesante por el mecanismo regulatorio que se puede estudiar en ellas. Son mutantes que afectando la actividad de una enzima por modificar un producto difusible que mapea muy cerca o dentro del gene estructural de esa enzima le permiten a la bacteria crecer en presencia de uno de los productos de la vía que se afecta. En S. typhi este producto, la metionina - es convertida a cisteína, que normalmente es uno de sus precursores. Sería interesante averiguar la relación que existe entre la mutación que presentan estas cepas y la expresión de la o las enzimas que catalizan esta conversión.

Los resultados reportados por Qureshi et al (19) en Salmonella typhimurium y el modelo que postulan para explicar el fenotipo de las cepas Cym^- excluyen la posibilidad de que se puedan obtener mutantes con este fenotipo por inserción o deleción, ya que en este organismo la metionina no se convierte en cisteína, y se postula que su papel es el de permitir la utilización de sulfato por restablecer la actividad enzimática afectada, esto se haría por la interacción de la metionina con una proteína - que pudiera ser la misma enzima.

El que en E. coli se hayan encontrado mutantes con este fenotipo por inserción de $tn5$ obligaría a pensar en otro mecanismo - para explicar este tipo de mutantes en esta bacteria.

Parece poco probable que en tres bacterias tan cercanas evolutivamente y que tienen una vía de asimilación de azufre similar, se presenten un tipo de mutantes regulatorias con un fenotipo igual y que el mecanismo que produce ese fenotipo sea completamente distinto. Para excluir esta posibilidad y determinar cuál sería el mecanismo regulatorio involucrado en estas mutantes tendrían que hacerse estudios mucho más detallados de éstas en las tres enterobacterias, se tendrían que buscar mutantes con este fenotipo por delección, inserción y termosensibles y hacer un mapeo muy fino de ellas para determinar si realmente están en el gene estructural de alguna de las enzimas de la biosíntesis de cisteína, también sería necesario encontrar mutantes en las que se demuestre por criterios fisicoquímicos - que alguna de esas enzimas esta modificada; ya sabiendo esto - sería necesario hacer experimentos de cinética de incorporación de (^{35}S) O_4 y metionina (^{35}S) en los distintos intermediarios de la vía, usando las mutantes y las cepas prototrofas.

Figura 1: Vía de asimilación de sulfato en Salmonella typhimurium

cis A: permeasa de sulfato
 cis C: adenilsulfato cinasa
 cis D: adenilsulfato transferasa
 cis H: adenilsulfato reductasa

cis I,J,G: sulfito reductasa
 cis E: serina acetiltransferasa

Abreviaciones:

APS: adenilsulfato
 PAPS: fosfo adenilsulfato
 OAS: O-acetil serina

T A B L A I

CEPAS DE SALMONELLA TYPHI UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

<u>CEPA</u>	<u>FAGOTIPO</u>	<u>CARACTERISTICAS</u>	<u>ORIGEN</u>
JM2053	E I	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1972
JM2169	E I	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1975
ST 6	Vi deg	Cm ^r , Sm ^r , Tc ^r , Su ^r	CD. MEXICO, 1974
JM2778	Vi deg	Cm ^r , Sm ^r , Tc ^r , Su ^r	CD. MEXICO, 1975
ST II	Vi deg	Cm ^r , Sm ^r , Tc ^r , Su ^r	CD. MEXICO, 1976
ST IIa	Vi deg	MULTISENSIBLE, SIN PLASMIDO	DERIVADA DE LA ST II
JM3618	35	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1977
JM3654	35	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1978
JM3745	Vi deg	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1979
JM3746	Vi deg	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1979
JM3664	E I	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1960
26	26	MULTISENSIBLE	CEPA FAGOTIPO
Ty 2	E I	MULTISENSIBLE	OMS, Zagreb
JM 1300	Vi deg	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1975
JM 1382	Vi deg	Nal ^r Finf ⁻	DERIVADA DE LA JM 1300
Z A I	Vi deg	Hf ^r Nal ^r Kan ^r	DERIVADA DE LA CEPA JM 1382
G S6	Vi deg	Nal ^r Thr ⁻	DERIVADA DE LA JM 3746
G S7	Vi deg	Hfr, Nal ^r , Rif ^r	DERIVADO DE LA GS 6 y AG I.

T A B L A I

CEPAS DE SALMONELLA TYPHI UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

<u>CEPA</u>	<u>FAGOTIPO</u>	<u>CARACTERISTICAS</u>	<u>ORIGEN</u>
JM2053	E I	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1972
JM2169	E I	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1973
ST 6	Vi deg	Cm ^r , Sm ^r , Tc ^r , Su ^r	CD. MEXICO, 1974
JN2778	Vi deg	Cm ^r , Sm ^r , Tc ^r , Su ^r	CD. MEXICO, 1975
ST II	Vi deg	Cm ^r , Sm ^r , Tc ^r , Su ^r	CD. MEXICO, 1976
ST IIa	Vi deg	MULTISENSIBLE, SIN PLASMIDO	DERIVADA DE LA ST II
JM3618	35	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1977
JM3654	35	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1978
JM3745	Vi deg	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1979
JM3746	Vi deg	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1979
JM3664	E I	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1960
26	26	MULTISENSIBLE	CEPA FAGOTIPO
Ty 2	E I	MULTISENSIBLE	OMS, Zagreb
JM 1300	Vi deg	MULTISENSIBLE	CD. MEXICO, 1973
JM 1382	Vi deg	Nal ^r Finf ^r	DERIVADA DE LA JM 1300
Z A I	Vi deg	Hf ^r Nal ^r Kan ^r	DERIVADA DE LA CEPA JM 1382
G S6	Vi deg	Nal ^r Thr ^r	DERIVADA DE LA JM 3746
G S7	Vi deg	Hfr, Nal ^r , Rif ^r	DERIVADO DE LA GS 6 y AG I.

T A B L A I I

CEPAS DE ESCHERICHIA COLI UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

<u>CEPA</u>	<u>CARACTERISTICAS</u>	<u>PROPORCIONADA POR</u>
AB259	Hfr Hayes, BI ⁻	DR. A.L. TAYLOR
AG 1	Hfr Hayes, BI ⁻ , rif ^r DERIVADA DE LA AB 259	ALICIA GONZALEZ
JM245	leu B6, his1, recA1, thyA28, arg 6, met B1, lac Y1 gal6, mal A1, Jxy1-7, mtc-2, rps104, ton A2, tsx-1, λ ⁻ , sup-E44, F ⁺ 595, <u>pure⁺lac lys cysGDHIIJ thyA</u>	DR. B. BACHMAN
KLF41/JC1553	LeuB6, his 61, arg6, met B1, lac Y1, gal-6, syl-7, mt1-2, rps1104, tonA2, tsx-1, λ ^r , λ ⁻ , supE44, F ⁺ 41 <u>asd arg6</u>	DR. B. BACHMAN

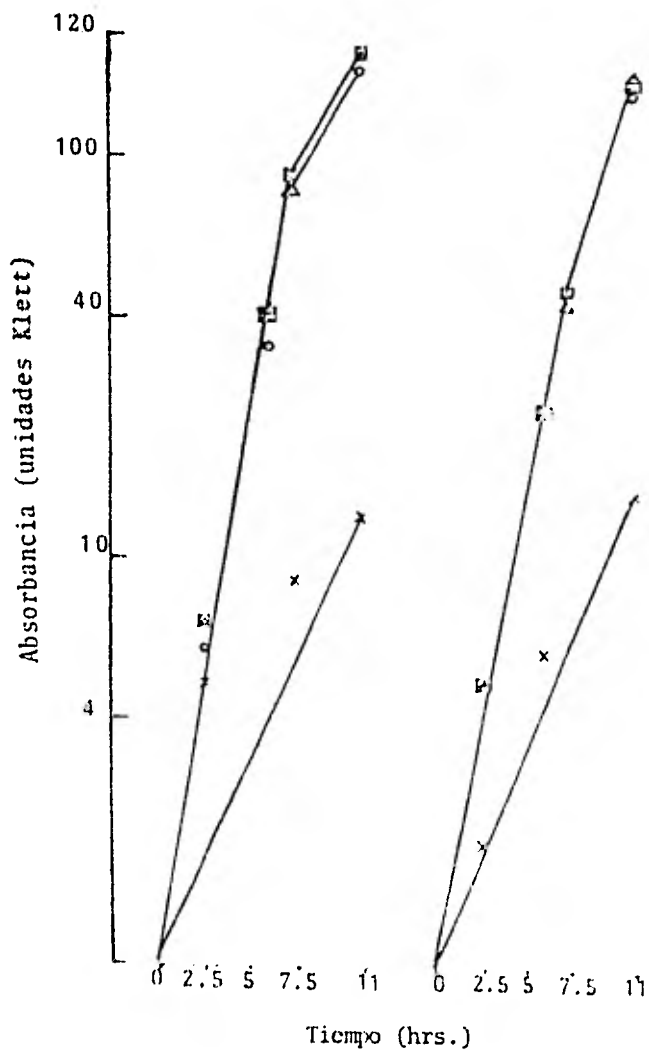


Figura 2. Curva de crecimiento en MM (x), MM cis (o), MMet (□) MMto (Δ) de las cepas (a): JM 3664, (b) St6.

T A B L A I I I

CRECIMIENTO EN CISTEINA Y METIONINA DE DIFERENTES CEPAS DE S.typhi

<u>CEPA</u>	<u>TIEMPO DE DUPLICACION (HRS)</u>				<u>AÑO AISLAMIENTO</u>
	MM	MMcis	MMmet	MMtio	
JM 2053	3	1.3	1.8	1.5	1972
JM 2169	5	1.2	1.	1.2	1973
ST 6	3	1.3	1.3	1.2	1974
JM 2778	5.5	1.5	1.5	1.5	1975
ST 11	3	1.4	1	1.6	1976
JM 3618	3	1.5	1.5	2	1977
JM 3654	2.5	1.7	1.5	1.7	1978
JM 3745	>23	1.5 (lag 12 hrs.)	>23	>23	1979
JM 3746	1	.9			1979
JM 3664	3.3	1	1	1	1960
26	2.7	1.6	1.6	1	---
Ty2	2.5	1.7	1.5	1.7	---

T A B L A I V

FRECUENCIA DE CEPAS DE S.typhi CON FENOTIPO Cym

<u>AÑO</u>	<u>No. CEPAS ANALIZADAS</u>	<u>% Cym</u>	<u>% Cis</u>	<u>% PROTOTROFAS</u>	<u>% OTRAS</u>
1972	44	97.6	----	----	3.4
1973-1976*	947	92			8
1977	43	67.4	----	----	32.6
1978	42	90.4			9.6
1979	41	17	31.7	39	13
1980	32	40.6	25	----	34.3

36

* DATOS REPORTADOS POR ALFARO Y MARTUSCELLI (12)

T A B L A V

CRECIMIENTO DE DIFERENTES CEPAS DE S.typhi EN PRECURSORES DE CISTEINA

<u>CEPA</u>	<u>TIEMPO DE DUPLICACION (hrs)</u>			<u>AÑO DE AISLAMIENTO</u>
	SO ₄ [■]	SO ₃ [■]	S [■]	
JM 2053	1.5	1.5	1	1972
JM 2169	2	2	1.5	1973
JM 2778	2	2	1.5	1975
ST II	1.7	1.7	1.3	1976
JM 3618	2	2	1.5	1977
JM 3654	1.7	2	1.5	1978
JM 3664	1.7	1.7	1.3	1960
26	1.7	2	1.3	---
Ty2	2	2	1.6	---

T A B L A V I

FRECUENCIA DE REVERSION ESPONTANEA DE DIFERENTES CEPAS DE S.typhi

<u>CEPA</u>	<u>FRECUENCIA</u>
JM 2053	4×10^{-7}
JM 2169	6×10^{-6}
JM 2778	3×10^{-6}
ST II	$1,1 \times 10^{-8}$
JM 3618	4×10^{-7}
JM 3654	5×10^{-8}
JM 3745	3×10^{-7}
JM 3664	$2,4 \times 10^{-7}$
26	5×10^{-8}
Ty2	64×10^{-8}

T A B L A V I I

CRECIMIENTO EN DIFERENTES MEDIOS DE LAS MUTANTES OBTENIDAS DE LA CEPA JM 3746

<u>CEPA</u>	<u>TIEMPO DE DUPLICACION (HRS)</u>						
	MM	MMcis	MMmet	MMtio	SO ₄ ^m	SO ₃ ^m	S ^m
GS 1	>10	3	5	3	3	3	2
GS 2	>10	1	>10	1	4.5	4.5	2.5
GS 3	>10	1.5	>10	1.5	3.5	2.5	1.4
GS 4	4.2	2.2	1	2.2	2.2	2.2	1.4
GS 5	2.5	1.6	1.3	1.9	3	1.8	1.6

Figura 3: a Patrón de aminoácidos y Radioactividad asociada a ellos de la cepa Stlla.

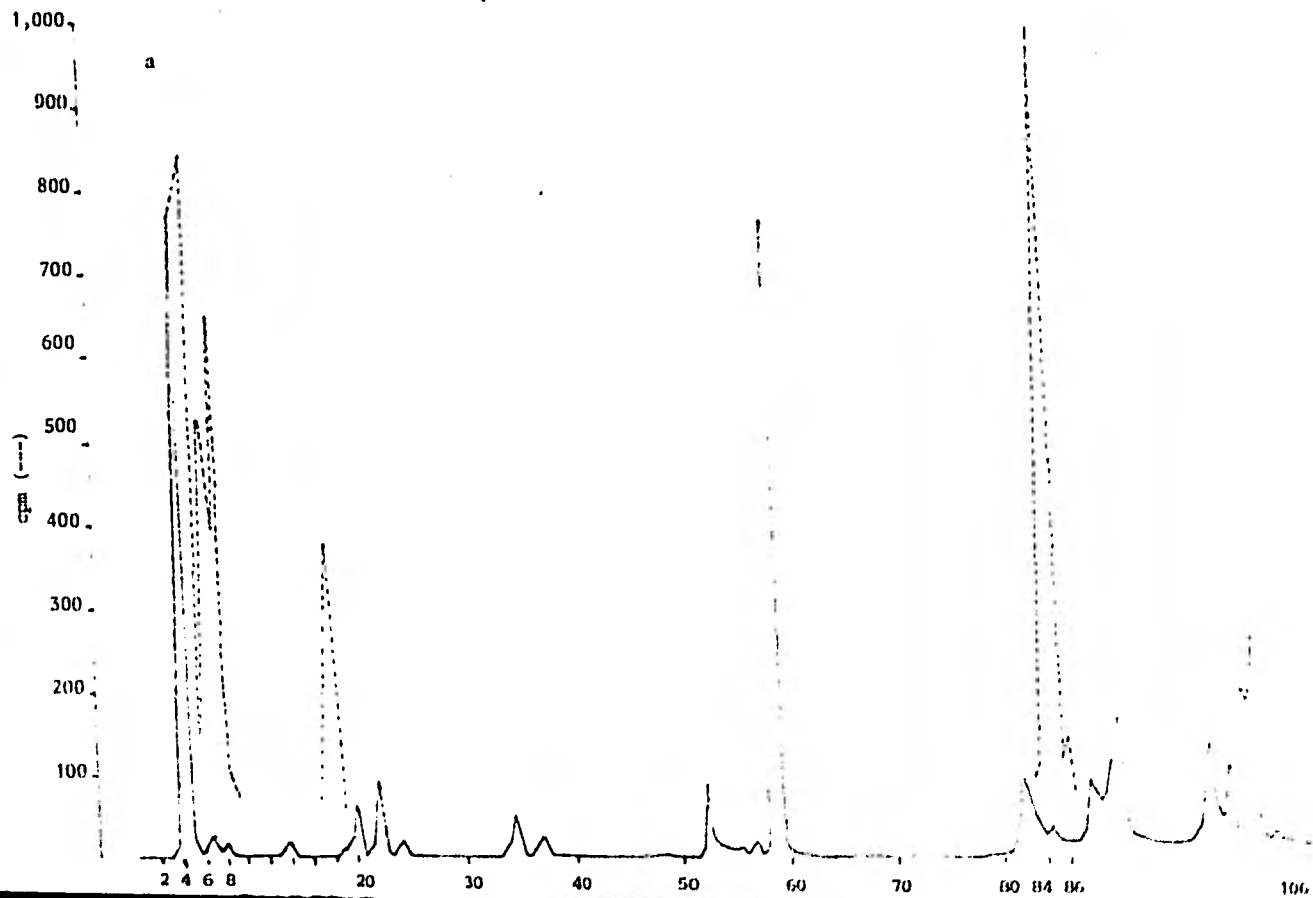
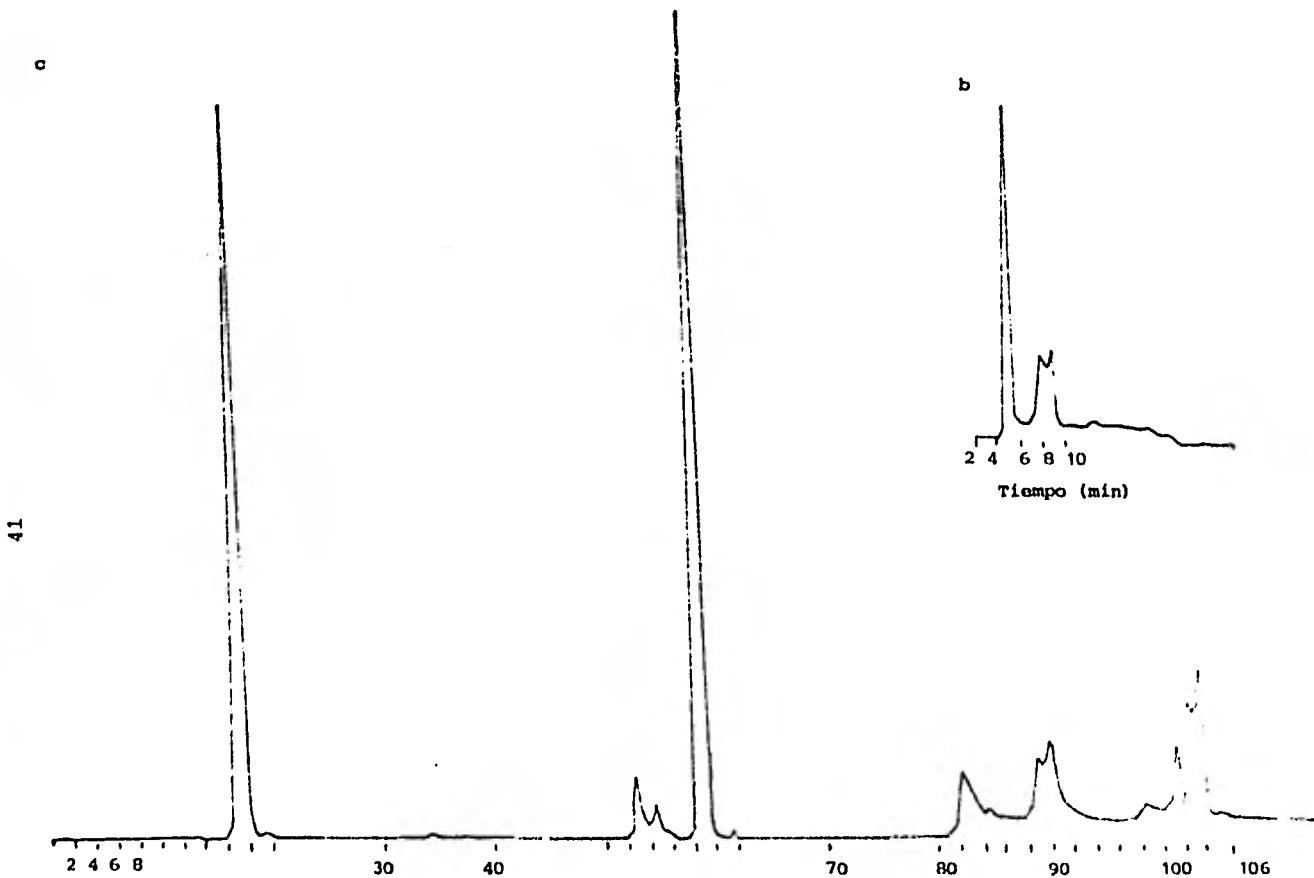


Figura 3; b (inserto) Patrón de fluorescencia de cisteína oxidada, c patrón de fluorescencia de metionina oxidada.



T A B L A V I I I

COMPLEMENTACION DE LAS CEPAS CIS - POR EL F' 595*

<u>CEPA</u>	<u>CRECIMIENTO EN:</u>		<u>ORIGEN</u>
	MM lac	MMcis lac	
JM 2053	-	+	1972
JM 1382	-	+	1973
JM 2169	+	+	1973
JM 2778	+	+	1975
ST 11a	+	+	1976
JM 3618	+	+	1977
JM 3654	+	+	1978
JM 3745	-	+	1979
JM 3664	-	+	1960
26	-	+	cepa fagotipo
Ty2	+	+	OMS, Zagreb
GS 1	-	+	oste trabajo
GS 2	-	+	" "
GS 3	-	+	" "
GS 4	-	+	" "
GS 5	+	+	" "

* F' lac thy cis C D H I J, derivado de Escherichia coli

T A B L A I X

CRUZA DE LA CEPA ZA 1 CON LAS MUTANTES Cym⁻

CEPA*	FRECUENCIA DE COLONIAS Cis ⁺	COMPLEMENTACION CON F'595
JM 2053	1.6 x 10 ⁻⁷	-
JM 3664	2 x 10 ⁻⁷	-
JM 3745	4 x 10 ⁻⁸	-
JM 1382	4 x 10 ⁻⁸	-
JM 2778	1.27 x 10 ⁻⁵	+
ST 11a	7.9 x 10 ⁻⁶	+
JM 3618	4.8 x 10 ⁻⁶	+
JM 3654	1.6 x 10 ⁻⁵	+
Ty2	1.15 x 10 ⁻⁵	+
GS 1	1 x 10 ⁻⁶	-
GS 2	6.25 x 10 ⁻⁶	-
GS 3	6.5 x 10 ⁻⁶	-
GS 4	5.2 x 10 ⁻⁶	-
GS 5	2.5 x 10 ⁻⁶	+

* Se utilizaron mutantes espontáneos resistentes a 100 ug/ml de sm de todas las cepas.

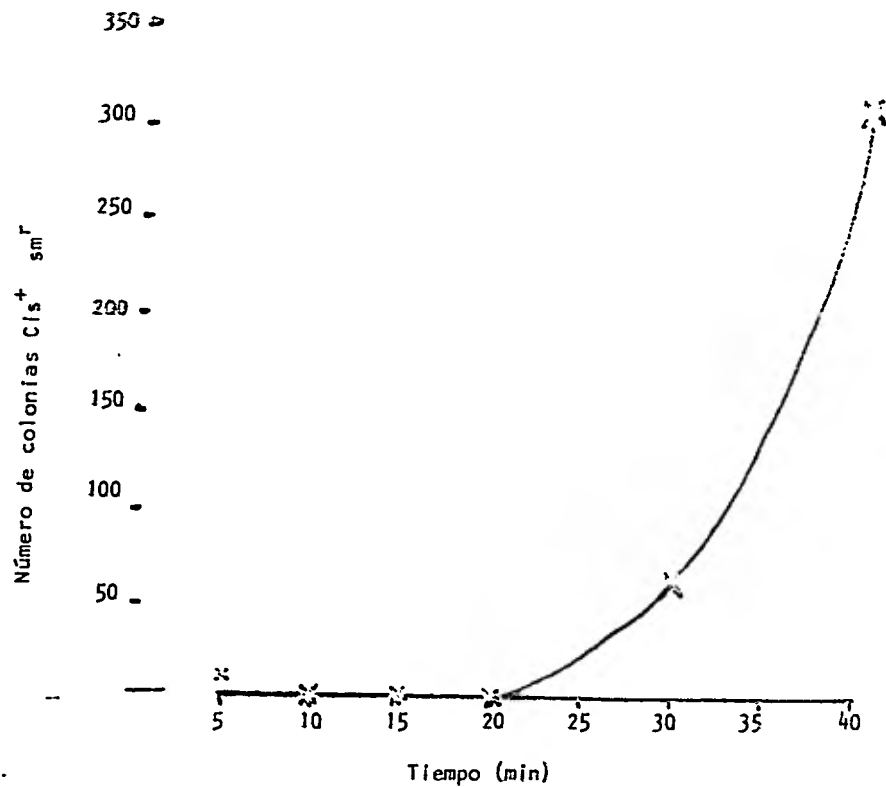


Figura 4; Cinética de aparición de colonias C1s+ sm^F de la cruz
entre las cepas G56 y JM3618 sm^F.

- 1.- De la Loza A y Moreno, M.L. (1975) Salud Publ. Mex 17: 181.
- 2.- González -C, A., Heredia, A., Guzmán, J., Ruiz, L. Hernández, H., Lechuga W., Cevallos, V., y Vázquez, H. (1974) Rev. Inv. Salud Publ. 34:37.
- 3.- Verduzco, E. Calderón, C. Velázquez E. (1974) Salud Publ. Mex. Epoca V 16 (1):9.
- 4.- Flores-E., J. (1973) Gac. Mbd. Mex., 106:11.
- 5.- Calderón, E., Gilman, R.H., Snyder, M.J., Vázquez, V., Gómez, D., Legorreta, J. Rodríguez, R., Martínez, E., Hornick, R. y Woodward, T.L., (1974) Rev. Latin.Amer. Microb. 16:131.
- 6.- Gangorosa, E.J. Bennet, J.V. Wyatt, C. Pierce, P.E., Ovarte, J., Mendoza, P. Vázquez, V. y Bessudo, D. (1972) J. Inf. Dis. 126:215.
- 7.- Olarte, J. y Galindo E. (1973) Antimicrob. Ag. C. Nemoth 4: 597.
- 8.- Bessudo, D., Olarte, J., Mendoza, P., Galindo E, Carrillo, J., Gutiérrez, G. y Kumate, J. (1973) Biol. of Sanit. Panam. 74:1.
- 9.- Anderson, E.S., (1974) WHO. Wkig Epid. Rec., 29:245.
- 10.- Mata, L. Gangorosa E., Cácores, A. Perera D. y Mejicanos M. (1970) J. Infect. Dis. 122:170.
- 11.- Varela, G. Mendoza P. y Vázquez, V. (1956) Rev. Inst. Salubr. Enfer. Trop. 16:23.
- 12.- Alfaro, G. y Martuscelli, J., en Temas Bioquímicos de Actualidad, Eds. Piña, E., Peña, A., Chagoga de Sánchez, V. y Martuscelli, J. (1978) UNAM pag. 281.

- 13.- Bacon, G.A., Burrows, T.W. y Yates M. (1950) British J. Exp. Pathol. 31:703.
- 14.- Bacon, G.A., Burrows, T.W., y Yates M. (1950) British J. Exp. Pathol 31:714.
- 15.- Bacon, G.A., Burrows, T.W., y Yates, M. (1951) British J. Exp. Pathol. 32:85.
- 16.- Formal, S.B., Baron, L.S. y Spilman W. (1954) J. Bact. 68:117.
- 17.- Kimura, M. y Onta, T. (1973) Genetics Supplement 73:19.
- 18.- Smith, D.A. (1974) Aduancesin Genetics 16:142.
- 19.- Qureshi, M.A., Smith, D.A. y Kingsman A.J. (1975) Jour. General Microbiol. 80:353.
- 20.- Lin, E.L., Lerner, S.A. y Jorgensen, S.E. (1962) Biochem. Biophys. Acta 60:422.
- 21.- Miller, J.H. en Experiments in Mblecular Genetics (1972) Cold Spring Harbor. New York. pag. 254.
- 22.- Hephron, F., Bedirger, J., Champour J. y Falkow, S. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. 74:702.
- 23.- Holiday, R. (1956) Nature 178:1987.
- 24.- Espin, G., Palacios, R., y Mora, J. (1979) Jour of Gen. Microbiol. 115:59.
- 25.- Moore, S. (1963) Jour of Biol. Chem 238 (1):235.
- 26.- Shaw, K.J. y Berg C.M. (1979) Genetic 92 (3):741.
- 27.- Anderson, E.S. y Felix A. (1953) J. Gen. Microbiol. 9:65.
- 28.- Dreyfuss, J. y Monty K., J. 1963) Jour. of Biol. Chem. 238 (3):1019.

- 29.- Braum, W. en *Bacterial Genetics*. (1966) W. B. Saunders Co. Filadelfia y Londres. pag. 190.
- 30.- Bachmann, B.J. Brooks Low, K., Taylor A.L. (1976) *Bact. Reviews*. 40 (1):116.
- 31.- Sanderson, K.E., y Demeroc, N. (1965) *Genetics* 51 (6):897.
- 32.- Barrett, E.L. Chang, G.W. (1979) *Jour of Gen. Microbiol.* 115:513.
- 33.- Ryan, F.J. y Schneider, L.K., (1949) *J. Bacteriol.* 58:201.
- 34.- Neilands, J.B. (1973) en *Inorganic Biochemistry*, G. Eichorn (ed) Elsevier. Amsterdam pag. 167.
- 35.- Weinberg, E.D. (1978) *Microbiol. Rec.* 42:45.

Agradecimientos:

Quisiera agradecer a las personas que de alguna manera contri
buyeron a la realización de esta tesis.

Al Dr. Jaime Martuscelli, por su apoyo, su valiosa disensión
a lo largo de todo el trabajo experimental y por todos los ges
tos de amistad que siempre ha tenido conmigo; a todos los miem
bros de su laboratorio por su cooperación y muy especialmente
a Alicia González por su entusiasmo para discutir mis resulta-
dos.

A la Dra. Carmen Gómez y al Dr. Fernando Bastarrachea quienes
siguieron de cerca esta investigación y me hicieron sugerencias
invaluables.

Al Dr. Rafael Palacios y al Dr. Jaime Mora por su constante y
estimulante interés en mi desarrollo académico y superación -
personal.

A Sarita Dávila quien transcribió este trabajo.