

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

21

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACION DE GENES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A NITROFURANTOINA EN Salmonella entérica

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ROSA MARIA BURGOS CHAIDEZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Identificación de genes asociados a la resistencia a la Nitrofurantoína en
Salmonella enterica.

realizado por

BURGOS CHAIDEZ ROSA MARIA

con número de cuenta **09852742-3**, quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
 Propietario

Dr. Rafael Camacho Carranza

Propietario

Dra. Patricia Ramos Morales

Propietario

Dra. Valeria Souza Saldívar

Suplente

Dr. Jesús Ramírez Santos

Suplente

Biól. Alfonso José Vilchis Peluyera

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
 DE BIOLOGÍA

**IDENTIFICACION DE GENES RELACIONADOS
CON LA RESISTENCIA A NITROFURANTOINA
EN *Salmonella entérica***

Rosa María Burgos Cháidez

22 de Octubre de 2003

I. INDICE

IDENTIFICACION DE GENES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A NITROFURANTOINA EN *Salmonella enterica*

I.	INDICE	4
II.	PREFACIO	7
III.	RESUMEN	8
IV.	INTRODUCCION	9
	A. Resistencia bacteriana a los antibióticos.	9
	a. Resistencia a fármacos	9
	b. Tipos de resistencia.	10
	c. Clases de resistencia por su origen	12
	d. Nuevas estrategias moleculares para el descubrimiento de Antibióticos y el estudio de las resistencias a ellos.	14
	B. Los compuestos nitroaromáticos y su activación.	15
	a. Los compuestos nitroaromáticos.	15
	b. Nitrofuranos.	16
	c. Activación de nitrofuranos	17
	C. Enzimas metabolizantes de nitrocompuestos.	18
	a. La nitroreductasa clásica en <i>Salmonella enterica</i> : NfsB-Cnr.	19
	b. La nitroreductasa A de <i>Salmonella enterica</i> : SnrA	20
	c. Evidencia de niveles adicionales de resistencia no explica- bles por las enzimas ya descritas.	
	D. La nitrofurantoína	23
	a. Nombre y estructura	23
	b. Uso	24
	c. Genotoxicidad	24
	d. Espectro de actividad	24
	e. Resistencia a la nitrofurantoína	25
	E. La mutagénesis dirigida con transposones como estraté- gia para generar mutaciones estables de pérdida de fun- ción.	25
	F. Cepas utilizadas en el rastreo de genes asociados con la resistencia a la nitrofurantoína	27
V.	OBJETIVOS	30

VI.	HIPOTESIS	30
VII.	METODOLOGIA	31
	A. Mapeo por frecuencia de cotransducción	31
	B. Localización de las inserciones Muϕ-Cam por reacción en la cadena de la polimerasa (PCR) semi-aleatorio	32
	C. Obtención de la concentración mínima inhibitoria de las 6 cepas candidatas a inserciones relacionadas con la resistencia a la nitrofurantoina	38
VIII.	RESULTADOS	39
	A. Localización de transposones por frecuencia de cotransducción	39
	B. Localización de transposones por PCR semi-aleatorio.	41
	a. Salmonella enterica serovar Typhimurium cepa RC1503.	41
	b. Salmonella enterica serovar Typhimurium cepa RC1501.	43
	c. Salmonella enterica serovar Typhimurium cepa RC1506.	44
	C. Determinación de la concentración mínima inhibitoria para las cepas candidatas	46
IX.	DISCUSION	49
	A. Sobre el mapeo por PCR semi-aleatorio	49
	B. Sobre el transportador dependiente de energia tipo ABC	50
	C. Sobre la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria para las cepas candidatas	51
X.	CONCLUSIONES	52
XI.	PERSPECTIVAS	53

XII. BIBLIOGRAFIA	55
--------------------------	-----------

XII. ANEXO	59
-------------------	-----------

A. Herramientas biológicas utilizadas en la construcción de las cepas RC1501-RC1507	59
--	-----------

a. Transposones derivados del fago Mu	59
1. Transposón Mud-Cam	59
2. Transposones MudJ y MudK	60
3. Derivados del transposón Tn10	61
4. Transposón T-POP	62
b. Generalidades del fago P22.	63

B. Métodos	64
-------------------	-----------

a. Cepas bacterianas	64
b. Medios de cultivo	64
c. Técnicas genéticas	64
d. Selección de mutantes en T-POP resistentes a nitrofurantoina	65
e. Determinación de la orientación y posición de la inserción del elemento T-POP en el gen <i>snrA</i>	68
f. Generación de la colección de fagos P22 HT con amplia representación del genoma de <i>Salmonella</i>	69
g. Transducción de la colección de Mud-Cam a la cepa con <i>snrA</i> inactivado seleccionando mayor resistencia a la Nf que en las cepas parentales	71

II. PREFACIO

La presente tesis es mi primer escrito científico formal. Su elaboración resulto ser un reto para mí porque requirió mucho mas tiempo, esfuerzo y trabajo del que pensé en un principio. Pero ahora reconozco la dificultad que conyeva el explicar las ideas, las metodologías y los resultados de una forma clara, concisa y coherente a la que nos enfrentamos en la Ciencia.

Quiero agradecer a las personas que me han dado soporte y apoyo en esta parte de mi ciclo de vida:

A mis padres; Fernando y Rosa María por ser tan pacientes conmigo.

A mi hermano Fernando por ser mi amigo y bicho experimental.

A mis profesores y profesoras de la Facultad de Ciencias de la UNAM, muy especialmente a mis sinodales Patricia Ramos, Valeria Souza y Jesus Ramírez.

A mis amigos de La Banda a quien estimo y extraño a distancia.

A mis amigos mas cercanos que me han echado porras y consejos desde lejos, mi querida Comagre Karla López (Mujer, gracias por tu amistad!) y mi siempre fiel y leal amigo Oscar Inda (Olvido teñido de rojo escarlata) y a Pablo Luis-Castillo por ser amigo y compañero en gran parte de este ciclo de mi vida.

Agradezco eternamente a los laboratorios y su gente que me han adoptado e introducido en diversas ramas del saber científico: Dra. Regina Montero (IIB), Dra. Patricia Ramos (FC), Dr. Javier Espinosa (IIB), Dr. Juan Pedro Laclette (IIB), Dra. Therese Markow (Center for Insect Science, U of Arizona) y Dr. Michael Wells (Dept. Biochemistry, U of Arizona).

A todos mis maravillosos bichos (*Salmonella*, *Aedes*, *Drosophila*...)

III. RESUMEN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de gran importancia en el sector salud y socioeconómico. El conocimiento de los factores que participan es imperativo para controlar su emergencia y dispersión. Así surge la necesidad de ahondar en el conocimiento de los genes involucrados tanto en las vías de activación de los antibióticos como en cualquier otro mecanismo que confiera resistencia. En el presente trabajo se rastreó la localización de transposones Mu α -Cam insertados aleatoriamente en 7 cepas de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium dirigidos hacia genes involucrados con la resistencia a un compuesto nitroaromático modelo en estudios toxicológicos y utilizado como antibiótico para el tratamiento de infecciones urinarias llamado nitrofurantoína. Con esta metodología se logró localizar al transposón Mu α -Cam en la cepa RC1501 dentro de un URF (Unidentified Reading Frame – Gen no identificado) con dominios de transportador transmembranal dependiente de energía tipo ABC, relacionándolo así con el fenotipo resistente a la nitrofurantoína en esa cepa; mientras que las cepas RC1503 y RC1506 contienen Mu α -Cam en el gen de la nitroreductasa clásica *cnr*. La cepa RC1507 no presentó un fenotipo resistente a la nitrofurantoína mayor a la cepa silvestre, por lo que es descartada como candidata para rastreo de genes relacionados con la resistencia. Con las metodologías utilizadas no se localizó el Mu α -Cam en las tres cepas restantes; RC1502, RC1504 y RC1505.

IV. INTRODUCCIÓN

A. La resistencia a los antibióticos.

a. Resistencia a los antibióticos.

Los antibióticos son de un valor inmenso en el combate de enfermedades infecciosas y se estima que han incrementado en 10 años el promedio de vida de los ciudadanos estadounidenses. En décadas recientes, su efectividad ha estado en peligro por un aumento en la prevalencia de la resistencia bacteriana. Ya que las infecciones bacterianas pueden generalmente ser tratadas con distintos antibióticos, la resistencia a un antibiótico no se debe traducir directamente como una falla terapéutica. La resistencia y el riesgo de la terapia inapropiada limita cada vez mas las opciones terapéuticas. Para algunos patógenos importantes, en los cuales existen serios problemas de resistencia persisten pocos antibióticos efectivos (Hughes, 2003).

No existen agentes antibacterianos contra los cuales las bacterias no hayan sido capaces de desarrollar resistencia con la posible excepción de algunos péptidos antibacteriales hechos por el sistema inmune innato (Zaslloff, 2002).

Los genes que confieren resistencia a los antibióticos están ampliamente dispersos en la naturaleza y son intercambiados entre

organismos patógenos. El amplio uso de los antibióticos constituye una poderosa presión selectiva que favorece el aumento de bacterias resistentes (Drlika, 2001).

Como consecuencia, la resistencia a un nuevo antibiótico es detectada en clínica de 2 a 5 años después del inicio de su comercialización (Bushman,2002).

Por estas razones, en el tratamiento de enfermedades infecciosas, la resistencia bacteriana es uno de los problemas más serios clínicos y socioeconómicos actuales.

b. Tipos de resistencia.

Se delinearán tres mecanismos principales para la aparición de resistencia a los antibióticos (Bushman,2002). Hay que recordar que los genes necesarios para cada tipo de resistencia a antibióticos pueden estar codificados en cromosomas, plásmidos y transposones capaces de transferirse horizontalmente.

En el primer mecanismo, la resistencia surge cuando un organismo produce una enzima que modifica la molécula del antibiótico y la inactiva. Por ejemplo, la resistencia contra la penicilina y otros antibióticos β -lactámicos es conferida por los genes que codifican para la enzima β -lactamasa (*bla*), enzima que rompe el anillo β -lactámico. También algunas formas de resistencia a eritromicina surgen cuando la bacteria produce enzimas que agregan grupos

químicos (grupos metilo) a la eritromicina volviéndola inactiva (Bushman,2002).

Otra forma de resistencia a los antibióticos ocurre cuando la molécula blanco del antibiótico es modificada. En el caso de la vancomicina, algunas cepas bacterianas son resistentes porque han reemplazado la unión D-Alanina-D-Alanina en sus paredes celulares por una unión D-Alanina-D-Lactato. Este tipo de resistencia se ha dispersado vía la transferencia lateral de genes que especifican la síntesis de D-Alanina-D-Lactato, llamado grupo génico *van* (Bushman,2002).

La tercera forma de resistencia a los antibióticos aparece por alteraciones en la bacteria que reducen la concentración interna del antibiótico en una célula. Esto puede ocurrir a través de la expresión de proteínas asociadas a la membrana bacteriana y que bombean activamente los antibióticos hacia fuera. Algunos tipos de resistencia a la tetraciclina son un ejemplo. En una forma relacionada de resistencia, la entrada de los antibióticos a la célula es bloqueada. Los antibióticos β -lactámicos entran a las células a través de poros o canales de proteínas en la pared celular. Mutaciones en los genes *porin* que codifican las proteínas de estos canales, bloquean la entrada de estos antibióticos volviendo a las células insensibles (Bushman,2002).

c. Clases de resistencia por su origen.

La resistencia puede ser intrínseca o adquirida (Normark y Normark, 2002):

La resistencia intrínseca significa que todos los organismos de una especie bacteriana son resistentes, sin sufrir alteración genética. Por ejemplo, el micoplasma es siempre resistente a los antibióticos β -lactámicos ya que carecen del peptidoglicano blanco como parte de su pared celular (Normark y Normark, 2002).

De igual manera, bacterias entéricas incluyendo a *Pseudomonas aeruginosa*, exhiben una baja susceptibilidad a antibióticos hidrofóbicos como los macrólidos porque éstos tienen baja penetración por la membrana externa de estos organismos. Aún los antibióticos hidrofílicos pueden ser parcialmente restringidos para penetrar la membrana externa ya que éstos tienen que utilizar canales proteínicos llenos de agua, llamados porinas (Normark y Normark, 2002).

Otro mecanismo, ya antes mencionado, es el uso de bombas protéicas multidroga dependientes de energía. Estas, además de antibióticos promueven la exportación de detergentes, inhibidores, desinfectantes y solventes orgánicos. Estas bombas están presentes en bacterias aunque no proveen de resistencia intrínseca y sólo revelan el fenotipo resistente cuando son sobreexpresadas por mutaciones (Normark & Normark, 2002).

Aunque la función original de estos sistemas de resistencia es desconocido, su contribución a la resistencia intrínseca y adquirida, así como su conservación en un número de importantes patógenos humanos hace de ellos blancos lógicos para la intervención terapéutica.

La resistencia adquirida a los antibióticos ocurre tanto por mutaciones (mutaciones puntuales, deleciones, inversiones, inserciones, etc. dentro del genoma bacteriano) o por transferencia génica horizontal. Para cada clase de antibióticos hay usualmente un número de mecanismos que pueden causar resistencia. Estos mecanismos pueden también diferir dependiendo de la especie bacteriana y su perfil genético.

Mutaciones cromosomales que causan resistencia a los antibióticos pueden imponer costos a la adecuación en la bacteria. Este costo biológico puede ser reducido por mutaciones adicionales. Las mutaciones compensatorias son usualmente más comunes que la verdadera reversión ya que la tasa de mutación para la compensación es mayor (porque el blanco mutacional es más amplio) que para la reversión. Por lo tanto es poco probable que las variedades resistentes desaparezcan de la población mientras se sigan produciendo cuellos de botella (selección) que favorezcan a las bacterias resistentes aunque tengan una baja adecuación, así

estas variedades podrían no desaparecer de la población bacteriana (Maisnier-Patin *et al*, 2002).

d. Nuevas estrategias moleculares para el descubrimiento de antibióticos y el estudio de la resistencia a los antibióticos.

Alteraciones moleculares menores pueden hacer la diferencia, y las bacterias patógenas son seleccionadas artificialmente para sobrevivir a la acción de los antibióticos. Por esto existe la necesidad de descubrir antibióticos nuevos, mejorar los ya existentes o aún reconsiderar algunos en desuso. Históricamente el descubrimiento de drogas se realizaba con base en sistemas celulares, en los cuales las moléculas de interés eran aplicadas a las células bacterianas vivas. Este método fue exitoso y concluyó con el descubrimiento de drogas. La ventaja de esto yace en su simplicidad y en el hecho de que cada blanco posible en la célula era revisado. Pero este método tenía la desventaja de que varios blancos eran compartidos tanto por bacterias como por humanos, así que la mayoría de los compuestos resultaban tóxicos y tampoco se obtenía información acerca del mecanismo de acción.

Los blancos conocidos de los antibióticos han resultado ser productos de genes esenciales, su mal funcionamiento causa la muerte celular. Las herramientas generadas por la Biotecnología están haciendo sencilla y rápida la identificación de estos genes

esenciales. En organismos con el genoma secuenciado como la bacteria *Escherichia coli* o la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cada gen puede ser inactivado experimentalmente y su efecto puede ser evaluado. Algunos análisis comparativos de genomas muestran que existen menos de 300 genes esenciales de amplio espectro que son blancos potenciales para nuevos antibióticos (Hughes, 2003).

B. Los compuestos nitroaromáticos y su activación.

a. Los compuestos nitroaromáticos

Los compuestos nitroaromáticos están ampliamente representados en la naturaleza; a finales de la década de los setenta se empezó a demostrar que los hidrocarburos aromáticos policíclicos reaccionan con óxidos de nitrógeno para formar nitroaromáticos. Los compuestos nitroaromáticos son utilizados en la industria química, y un grupo de nitrofuranos y nitroimidazoles han sido utilizados en todo el mundo como fármacos. Así, nos encontramos expuestos a uno o más compuestos nitroaromáticos por una gran variedad de rutas (Purohit y Basu, 2000). El blanco biológico es principalmente el ADN. Los compuestos nitroheterocíclicos reducidos causan rompimiento de cadenas y desestabilización de la hélice. El grado de daño está relacionado con la composición de bases, y es proporcional al contenido de A+T (Tocher, 1997).

Los compuestos nitroaromáticos utilizados como antibióticos son característicos por su rango de actividad y la relativa deficiencia para generar resistencia. Las bases para la toxicidad selectiva de estas drogas dependen de la reducción del grupo nitro, que actúa como un mímico del O₂- y actúa como un aceptor de electrones (Tocher, 1997).

b. Nitrofuranos.

Los nitrofuranos son una familia de antibióticos sintéticos ampliamente empleados en medicina, preservación de alimentos, etc., en los cuales se les han detectado propiedades mutagénicas y carcinogénicas (Cohen, 1978). La nitrofurazona y la nitrofurantoina son dos de los nitrofuranos más estudiados; el primero ha sido empleado en el tratamiento de infecciones ectópicas, mientras que el segundo es utilizado en el tratamiento de infecciones del tracto urinario. (Purohit y Basu, 2000).

c. Activación de nitrofuranos

La forma precisa de acción de los nitrofuranos no es conocida, pero aparentemente la nitrofurantoina y nitrofurazona tienen efectos similares en las bacterias (Burgos *et al*, 2002).

- i) Ambos compuestos son activados por nitroreductasas a su forma bactericida, la cual se une al ADN y proteínas inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos.
- ii) Mutantes *recA*, *lexA* o *uvr*, incrementan la sensibilidad a los derivados de nitrofuranos, lo cual sugiere que estos antibióticos tienen un efecto directo en el ADN.
- iii) Estudios hechos en *Vibrio cholerae* sugieren la unión de la droga al ADN a través de intercalación.
- iv) Otra visión apoya como mecanismo de toxicidad la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).
- v) La resistencia a uno de los antibióticos, frecuentemente está asociada con bajos niveles en la actividad de nitrorreducción celular, y con resistencia al segundo fármaco nitroaromático.

C. Enzimas metabolizantes de nitrocompuestos

La resistencia microbiana a los nitrocompuestos se ha caracterizado por realizarse por pasos o niveles de resistencia. Los estudios tempranos de la bioquímica de las nitroreductasas mutantes sugieren que el incremento en la resistencia esta asociado con la inactivación secuencial de multiples nitroreductasas. Aunque ya se tienen identificadas a las principales nitroreductasas participantes en el proceso de activación de nitrocompuestos, el lazo directo entre mutación en los genes codificantes de estas y el desarrollo de la resistencia bacteriana aun tiene que ser establecido (Whiteway *et al*, 1998).

Las nitroreductasas son enzimas que catalizan la reducción biológica del grupo funcional NO₂ en bacterias y mamíferos, y la mutagenicidad de los compuestos nitroaromáticos es dependiente de su actividad (Whiteway, 1998); *Salmonella typhimurium* posee enzimas con actividad de nitroreductasa y por tanto es capaz de activar diversos compuestos aromáticos nitrogenados (Yamada *et al*, 1997).

a. La nitroreductasa clásica en *Salmonella entérica*: *nfsB- cnr*.

Watanabe *et al* (1990) identificaron al gen *cnr* como el responsable de la actividad de nitroreductasa en *Salmonella*.

Sin embargo, al hacer la disrupción del gen *cnr* mediante la inserción de un cassette de kanamicina en las cepas TA1535 y TA1538, los niveles de actividad de nitroreductasa celular se redujeron en un 73 y 1.5% respectivamente (Yamada *et al*,1997). Esto sugería que otro u otros genes en adición a *cnr* estaban involucrados en la actividad de nitroreducción en la cepa TA1535, y que la cepa TA1538 posee alguna mutación no presente en TA1535 asociada con la nitroreducción. Tabla 1.

Tabla 1. Nitroreductasas reportada en *E. coli* y *S. entérica* serovar Typhimurium (Carroll, 2002).

Cepas	Familia NfsA	Familia NfsB
<i>E. coli</i>	NfsA (MdaA)	NfsB
<i>S. typhimurium</i> TA1535	SnrA	Cnr
<i>S. typhimurium</i> TA1538	-	Cnr

El producto del gen *cnr* en *Salmonella* tiene la mayor proporción de la actividad total nitroreductasa independientemente de la

presencia de oxígeno (insensible) y el gen homólogo *nfsB* tiene una actividad importante, aunque menor en *E. coli*. NfsB es una flavoproteína dimérica que contiene FerrinMonoNucleótido (FMN) y puede usar tanto NADH o NADPH como cofactor. *nfsB* de *E.coli* es 88.5% idéntico al gen de la nitroreductasa clásica (*cnr*) de *S. entérica* serovar Typhimurium, y es su gen ortólogo, en la práctica se consideran el mismo gen (Carroll et al, 2002).

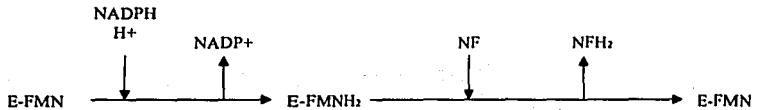


Figura 1. Mecanismo de catálisis deducido para NfsB de *E. coli* llamado ping pong bi-bi (Zenno, 1996). La enzima cataliza el flujo de electrones necesarios para la reducción del NF (Nitrofurano) por medio de la reducción cíclica de su cofactor FMN regenerándose el complejo.

b. La nitroreductasa A de *Salmonella*: SnrA.

El producto del gen *snrA*, recientemente identificado (Nokhbeh, 2002) en *Salmonella entérica* serovar Typhimurium (también

llamado *mdaA* y *nfsA* en *E. coli*) tiene un 93% de identidad con NfsA; esta proteína muestra además las propiedades cinéticas y de inducibilidad de NfsA de *E. coli*. (Carroll, 2002). Este producto es extremadamente efectivo en la activación metabólica de un amplio rango de compuestos nitrosustituidos estructuralmente diversos. SnrA es una proteína dimérica que contiene flavin mononucleótido (FMN), tiene una masa molecular de 26.8 kDa, usa NADPH para reducir equivalentes y usa el mecanismo de catálisis llamado ping-pong Bi-Bi (Fig.1) (Zenno, 1996). *snrA* ha sido identificado como un miembro del regulon *soxRS*, así junto con el ORF *y bjc* constituye un operón funcional en *E. coli* que es inducible por el químico paracuat y tiene una función protectora contra el estrés oxidativo. (Paterson, 2002).

- c. Evidencia de niveles adicionales de resistencia no explicables por los genes ya descritos.

En la prueba de Ames, empleando lisados de una cepa con la disrupción de ambos genes para nitroreductasas en *Salmonella* y utilizando como activador el 1-Nitropireno (1-NP) se conserva el 8.69% de la activación del compuesto (Tabla 2). Esto señala la posibilidad de presencia de otros genes involucrados en la nitroreducción (Ibarraran-Viniegra *et al*, 2002).

CEPAS <i>Salmonella entérica</i> serovar Typhimurium	Porcentaje de Activación de 1-NitroPireno con lisados de <i>Salmonella snrA-cnr-</i> en la Prueba de <i>Ames</i>
Wt	100%
SnrA-	60.4%
Cnr-	16.99%
SnrA-Cnr-	8.69%

Tabla 2. Evidencia de la actividad remanente del compuesto 1-NP en células tratadas con lisados de cepas de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium con las nitroreductasas *snrA* y *cnr* interrumpidas. Esto se mide en el numero de revertantes por mutación puntual en cepas de Ames TA98. Así, observa actividad remanente no explicable por SnrA y Cnr.

Mecanísticamente, las cinéticas de NfsB y SnrA han sido investigadas con nitrofurazona como sustrato y se ha encontrado que son consistentes el mecanismo ping-pong Bi-Bi (Figura 1).

En un estudio realizado por Sastry y Jayaraman en *E. coli* se muestra que la mutación para la resistencia a la Nitrofurantoína no siempre involucra a los genes de las nitroreductasas, ya que se encontraron cepas resistentes que conservaron la actividad nitroreductora. Además sugiere la posibilidad de que genes para las "moléculas blanco" de los nitrofuranos (o sus derivados reducidos) podrían mutar y conferir resistencia (Sastry & Jayaraman, 1985).

Ante la observación de un tercer y aun un cuarto nivel de resistencia a nitrofuranos en *E. coli* no explicados se asume que existen factores adicionales que pueden modular la resistencia a los nitrofuranos. Dentro de las posibles explicaciones se incluyen (i) una enzima nitroreductasa distinta de NfsA o NfsB, (ii) un factor en *trans* cuya interacción es esencial para una actividad de nitroreducción completa o (iii) un factor que media el transporte del nitrofurano en la célula (Whiteway *et al*, 1998).

D. Nitrofurantoina.

a. Nombre y estructura.

Nombre químico 2,4-Imidazolidinedione, 1-[(5-nitrofurildurideno) amino] hidantoina (Gulati *et al*, 1997).

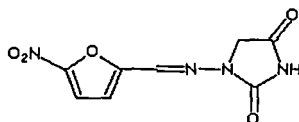


Figura 2. Estructura química de la nitrofurantoina.

b. Uso.

La Nitrofurantoína es usada extensivamente en el tratamiento y profilaxis de infecciones no complicadas del tracto urinario bajo (Gulati *et al*, 1997).

c. Genotoxicidad.

En series de experimentos en cepas de *E.coli* con mutaciones en genes involucradas en excisión, recombinación y vías de reparación SOS, se confirmó la participación de estas vías en la remoción de las lesiones en el ADN inducidas por la nitrofurantoína, esto fue corroborado mediante la inducción de prófago dependiente de la dosis. El aumento significativo de la sensibilidad de las cepas de *E.coli* *lexA1* y *recA* y la inducción de prófago da soporte a la idea de que el daño al ADN generado por la nitrofurantoína da lugar a la activación e inducción de la síntesis de proteína RecA o también llamada vía de reparación SOS. En contraste, la inducción lisogénica ha sido siempre considerada una consecuencia de la vía SOS (Sengupta *et al*,1990).

d. Espectro de la actividad.

El compuesto es activo contra una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas; como *Escherichia coli*, *Escherichia*

faecalis, *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus faecalis* (Farrell et al, 2003).

e. Resistencia a la nitrofurantoína

Se desarrolla muy poca resistencia entre poblaciones de microorganismos inicialmente sensibles a la droga. Los organismos que son generalmente resistentes a la acción de la nitrofurantoína son: *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae* (Farrell et al, 2003).

E. La mutagénesis dirigida por transposones como estrategia para generar mutaciones estables de pérdida de función.

La metodología de mutagénesis por medio del transposón Mu fué utilizada ampliamente en la construcción de las cepas de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium utilizadas en este trabajo de mapeo e identificación de genes relacionados con la resistencia a la Nitrofurantoína.

Los elementos móviles o transposones son segmentos discretos de ADN que pueden insertarse en diversos sitios del genoma huésped. La transposición ocurre sin la necesidad de una secuencia homóloga extensiva o las funciones del gen *recA* requeridas en la clásica

recombinación homóloga. Los elementos transponibles han probado ser excelentes herramientas para la genética molecular (Craig, 1996). Existen dos clases mayores de transposones. Los transposones de clase I son retroelementos que usan la transcriptasa reversa para transponerse por medio de un ARN intermediario. Los elementos de clase II transponen directamente de ADN a ADN. Típicamente tienen secuencias terminales repetidas, codifican una transposasa y se mueven al sufrir una escisión de un sitio donador y se reinsertan en otro lugar. Las inserciones de transposones pueden alterar la regulación y expresión de genes, así que la mutagénesis por transposones es directamente aplicable en organismos para los cuales los transposones endógenos o heterólogos pueden ser controlados (Hamer *et al*, 2001).

Los transposones son una herramienta importante en el análisis genético, con aplicaciones al introducir mutaciones por inserción que provocan la pérdida de función del gen interrumpido, generando fusiones gen-operon para funcionar como reporteros, dando pistas físicas o genéticas para la clonación y análisis del ADN adyacente a la inserción (Craig, 1996).

La transposición *in vivo* facilita la generación de un número muy grande de inserciones independientes en una sola reacción. Se requiere idealmente que las inserciones sean simples, recuperables, independientes y aleatorias (Qimron *et al*, 2003).

La mutagénesis por transposones es una herramienta versátil, ya que se cuenta con una amplia batería de transposones y mini-transposones diseñados exclusivamente para el análisis genético y molecular (Berg & Berg, 1996).

El bacteriófago Mu, el cual usa la transposición del ADN para replicar su genoma, es uno de los elementos genéticos móviles mejor caracterizados y existen varios de ellos modificados y diseñados para tareas específicas. Las mutantes por transposición son analizadas individualmente por su función usando selección o búsqueda por el fenotipo, esta opción es aplicable también a las mutantes por inserción de Mu (Haapa *et al*, 1999).

La mutagénesis dirigida por transposones fue utilizada para la búsqueda de genes con funciones relacionadas con la resistencia. Así la identificación del lugar preciso de la inserción es indispensable en este proceso (Qimron *et al*, 2003).

F. Cepas utilizadas en el rastreo de genes asociados con la resistencia a la nitrofurantoína.

En cepas de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium *snrA*::T-POP (transposón T-POP insertado en el gen *snrA*) *zzz*::*Mud*-Cam (transposón *Mud*-Cam inserto aleatoriamente), se seleccionaron resistentes a 25 µg/ml de nitrofurantoína en aerobiosis (NOTA: El

primer nivel de resistencia a la nitrofurantoína observado en cepas *snrA*- es 10 µg/ml, por lo tanto se seleccionaron cepas con el segundo nivel de resistencia). El incremento en la resistencia puede ser atribuible a la disrupción del gen *cnr* codificante de la nitroreductasa de menor actividad o cualquier otro blanco. De estas cepas se cosecho fago P22 y se transdujo a la cepa silvestre aprovechando que la recombinación necesaria para la inserción del transposón utiliza las secuencias adyacentes homólogas. Se seleccionaron 7 cepas resistentes a cloramfenicol (antibiótico marcador de la inserción *Mud-Cam*), esperando que su inserción este relacionada con el aumento al segundo nivel de resistencia a la nitrofurantoína (Burgos *et al*, 2002).

Figura 3.

En resumen, se construyeron 7 cepas mutantes nombradas RC1501 a 1507 en las cuales la inserción aleatoria del elemento *Mud-Cam* esta relacionada con el incremento al segundo nivel de resistencia a la nitrofurantoína en aerobiosis (Burgos *et al*, 2002).

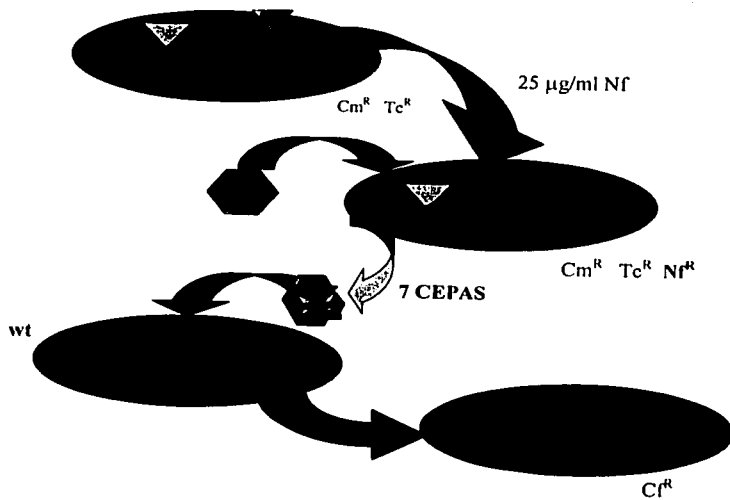


Figura 3. Selección del doble nivel de resistencia a la nitrofurantoína en cepas *snrA::TPOP zzz::Mud-Cam* y transducción de *Mud-Cam* a una cepa silvestre.

V. OBJETIVOS

- Localizar e identificar genes relacionados con la resistencia a la Nitrofurantoína en las cepas construidas con mutaciones por transposones en la bacteria *Salmonella entérica* serovar Typhimurium RC1501-RC1507.
- Determinar el nivel de resistencia a la nitrofurantoína desarrollado en las cepas mutantes.

VI. HIPOTESIS

- Ho – Si la actividad nitroreductora total no puede ser explicada por la actividad de las enzimas SnrA y Cnr en *Salmonella entérica* serovar Typhimurium (Ibarraran-Viniegra *et al*, 2002; Whiteway *et al*, 1998), entonces existe otra u otras enzimas nitroreductasas no descritas involucradas en la resistencia a la nitrofurantoína.
- Ha1 – Si la actividad nitroreductora total no puede ser explicada por la actividad de las enzimas SnrA y Cnr en *Salmonella entérica* serovar Typhimurium (Ibarraran-Viniegra *et al*, 2002; Whiteway *et al*, 1998), existe un factor que media el transporte del nitrofurano dentro de la célula.

VII. METODOLOGÍA

A. Mapeo por frecuencia de cotransducción.

La frecuencia de cotransducción puede servir como un marcador aproximado de la distancia entre dos marcadores, en este caso el elemento *Mud*-Cam presente en las 6 cepas candidato y una cepa *cnr::MudJ*. De acuerdo con la fórmula de Wu (1966) las frecuencias de cotransducción (F) son una función de la distancia entre marcadores en minutos de ADN empacado (*d*), la fórmula es: $F = (1 - d/L)^3$.

Con la transducción del elemento *Mud*-Cam rodeado de secuencias aleatorias en la cepa *snrA::T-POP* se descartó que la inserción de *Mud*-Cam se localice en el mismo gen, pero no se descarta la posibilidad de la inserción en el gen *cnr*.

Como la inserción en *cnr* es *Mud*-Cam (en la cepa RC1503), al igual que las inserciones de los demás candidatos, se construyó una cepa que tuviera un elemento *MudJ* (confiere resistencia a kanamicina) ligado al *cnr::Mud*-Cam. Esta cepa fue construida por transducción en RC1503 de una colección de fagos P22 representando 100,000 inserciones independientes *MudJ* en el genoma de *Salmonella*. Se seleccionaron cepas resistentes a kanamicina y se tamizó para detectar a aquellas colonias sensibles a cloramfenicol, buscando el reemplazo del segmento cromosomal en donde se aloja la inserción *Mud*-Cam de la RC1503 por *MudJ* – y asumir su localización cercana o dentro del gen *cnr*.

Se logró una inserción que cuando se transduce en RC1503 reemplaza 2.7% a la inserción *Mud*-cam en *nfnB*, lo cual ubica el elemento a no menos de 22.88 Kpb de distancia. Con este elemento se mapeó la proximidad de las demás inserciones *Mud*-Cam.

B. Localización de las inserciones del transposón *Mud*-Cam por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del tipo semi-aleatorio

En la PCR tipo Semi-aleatorio se emplea un oligonucleótido que alinea en el extremo de una región o secuencia conocida y una colección de oligonucleótidos que alinean semi-específicamente a una secuencia cercana desconocida. Las condiciones de alineamiento no específicas permiten el alineamiento del segundo oligonucleótido (Qinron *et al*, 2003). En nuestro caso los oligonucleotidos conocidos eran los dirigidos a los extremos del Transposon *Mud*-Cam (Figura 5), mientras que la colección de oligonucleótidos esta compuesta por los diseñados a partir del gen de la nitroreductasa *nfsB* en *Escherichia coli* y oligonucleótidos degenerados (Tabla 3).

El ADN de las distintas cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium fue aislado de colonias únicas cultivadas en NB-agar con el antibiótico correspondiente según el protocolo descrito por Sambroock *et al* (1989). Las reacciones de PCR fueron hechas en volúmenes de 20 μ l conteniendo 10 ng de ADN genómico, 10 pmol de cada oligonucleótido, y 0.25 mM de cada deoxinucleótido trifosfatado.

La *Taq* DNA polymerasa (Promega) fue agregada en compañía del anticuerpo *TaqStart Antibody* (Clontech) el cual garantiza el inicio de la polimerización cuando la temperatura se eleva a 72°C. La concentración de MgCl₂ en el buffer de PCR agregada fue dependiente de la exigencia deseada, usándose una concentración baja (1mM), mediana (2mM) o alta (3mM). Las mezclas de cada reacción fueron preincubadas por 5 min a 94°C y sujetas a 30 ciclos de 94°C (30s), y 72°C (50s) y un periodo de extensión final de 5 min. Las temperaturas de alineamiento también fueron variadas para modificar la exigencia de la reacción, utilizándose 40°C, 50°C y 60°C siguiendo la grafica descrita en la Figura 5 por el Dr. John Roth (<http://rothlab.ucdavis.edu/protocols/protocols>).

Los productos de las reacciones se corrieron en un gel de agarosa al 1% y las bandas visualizadas y definidas bajo luz UV (>10ng) fueron recortadas con la punta de una pipeta Pasteur y se embebieron en 100µl de TE a 4°C durante la noche. El sobrenadante de esta solución provee el ADN templado para la reamplificación con el oligonucleótido anidado, en el caso del uso de oligonucleótidos degenerados siguiendo el diagrama de flujo descrito en la Figura 6.

Si el producto reamplificado presenta el mismo tamaño que la banda original y demuestra dependendencia de ambos oligonucleótidos, se realiza una reacción a escala de 100µl, la cual es purificada con el kit

de extracción de agarosa Qiaquick para remover los oligonucleótidos y otros subproductos.

La secuencia de nucleótidos de las bandas obtenidas fueron determinadas por secuenciación automática, la secuencia se hizo para ambos sentidos. Y las secuencias resultantes fueron analizadas por el programa BLAST 2.2.1 para encontrar zonas homólogas en las bases de datos del sitio PubMed del NHI (National Health Institute, EUA) (www.ncbi.nih.gov/PubMed.html).

Como control de la reacción de amplificación se utilizó en ADN de la cepa silvestre (RC1) con amortiguador de concentración media y oligonucleótidos dirigidos al gen *snrA*.

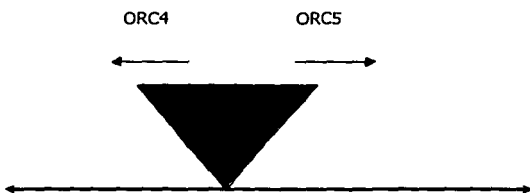


Figura 4. Posición y dirección de los oligonucleótidos diseñados a partir del transposón Muδ-Cam.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en PCR.

Primer	Secuencia	Origen- Comentario
ORC4	5'- ATCCCGAATAATCCAATGTCC -3'	Extremo izquierdo de Mu (Mu-L) Td = 64.6°C
ORC5	5'- GAAACGCTTTCGCGTTTTTCGTGC -3'	Extremo derecho de Mu (Mu-R) Td= 77.3°C
ODM1	5'- GCAGCCTATGATGACGGCTGAAACA -3'	Extremo izquierdo de NfnB de <i>Escherichia coli</i> . Td = 75.8°C
ORC6	5' -ACTTCTCAACAACCTCAGGAC GAACANNNNNNNNNGCAGC -3'	Oligonucleótido degenerado con G en la base anterior a la cola de degenerados
ORC7	5'- ACTTCTCAACAACCTCAGGAC GAACANNNNNNNNNACAGC -3'	Oligonucleótido degenerado con A en la base anterior a la cola de degenerados
ORC8	5'- ACTTCTCAACAACCTCAGGAC GAACANNNNNNNNNTCAGC-3'	Oligonucleótido degenerado con T en la base anterior a la cola de degenerados
ORC9	5'- ACTTCTCAACAACCTCAGGAC GAACANNNNNNNNNCCAGC -3'	Oligonucleótido degenerado con C en la base anterior a la cola de degenerados
ORC10	5'- ACTTCTCAACAACCTCAGGACGAACA -3'	Oligonucleótido P, fragmento común de los oligos degenerados, utilizado para reamplificar.

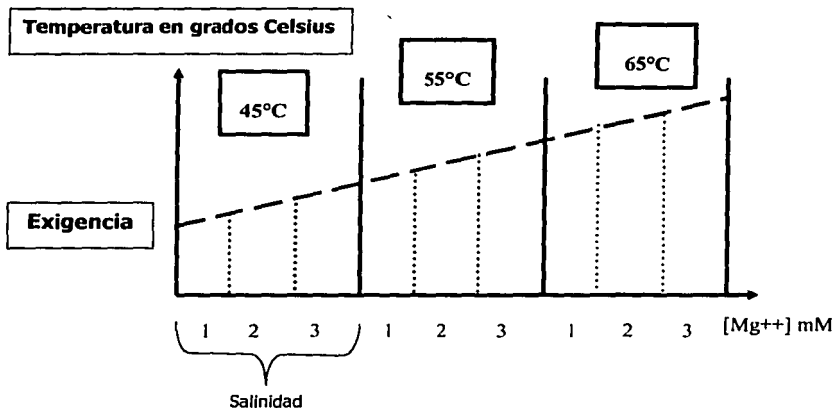


Figura 5. Gráfica de la relación entre la exigencia y la temperatura en la definición de amplificaciones.

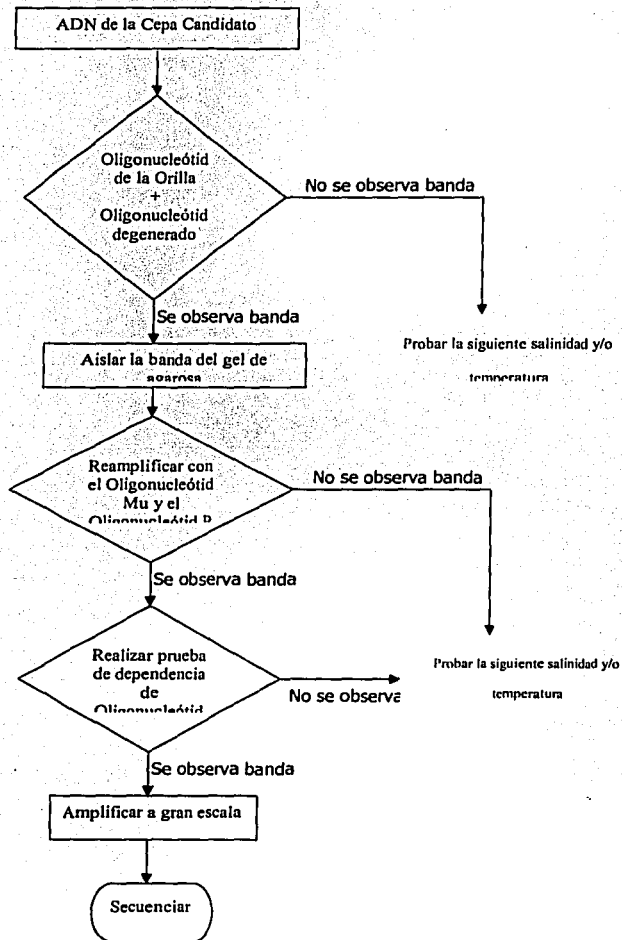


Figura 6. Diagrama de flujo para el rastreo del transposón Mu y zonas adyacentes con la colección de oligonucleótidos degenerados.

C.Obtención de la concentración mínima inhibitoria de las 6 cepas candidatas a inserciones asociadas con la resistencia la nitrofurantoína.

Se sembraron las 7 cepas en medio sólido con distintas concentraciones de nitrofurantoína, para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se utilizaron 5 concentraciones consecutivamente duplicadas de nitrofurantoína disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) -iniciando con 5 mg/ml- incluido en el medio NB-agar. Para prevenir la aparición de mutantes (1×10^{-6}) se hicieron las pruebas con un número menor a mil células para cada cepa, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, ya que las nitroreductasas pueden variar su actividad dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno.

VIII. RESULTADOS

A. Localización de transposones por frecuencia de cotransducción.

El reemplazamiento de un marcador -en este caso codificado por un transposón- por otro es la máxima expresión de la mínima distancia. Están tan cercanos que uno impide la expresión del otro. Por eso se utilizó el número de colonias que adquirieron la resistencia a kanamicina y perdieron la resistencia a cloramfenicol como número de cotransducciones en la cepa RC1503 infectadas con fágos P22 contenedores de inserciones MudJ.

Tabla 4. Resultados del mapeo por transducción en las cepas candidatas.

CEPA	# Colonias Kn ^R	# Colonias Kn ^R Cm ^S	Frecuencia de Cotransducción (F)	Distancia aproximada entre los marcadores (Kpb)
RC1501	172	6	0.0348	22.02
RC1502	84	0	0	-
RC1504	222	6	0.027	22.88
RC1505	133	6	0.0451	21.1
RC1506	169	1	0.0059	25.14
RC1507	111	6	0.054	20.32

Kn^R – Resistentes a la kanamicina
Cm^S – Sensibles al cloramfenicol

La frecuencia de cotransducción (F) y la capacidad de carga del fago P22 (42Kpb) fueron sustituidos en la formula despejada de Wu y el

resultado fué traducido de distancia expresada en minutos a kilobases.

Las distancias obtenidas son mayores a 20 Kpb, y salen del rango confiable donde los resultados son cercanos a la recta generada por la correlación de los puntos de la función descrita por Wu (1966). Por lo tanto los datos generados no son representativos de la distancia real entre los marcadores. Así que decidimos utilizar otro método para mapear la posición del elemento *Mu α -Cam*.

B. Localización de las inserciones del transposón *Mud-Cam* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del tipo semi-aleatorio

a. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cepa RC1503.

Se obtuvo una amplificación para la cepa RC1503 con los oligonucleótidos ODM1 y ORC4. Las dos secuencias obtenidas a partir de cada uno de los oligonucleótidos se traslapan por 609 pb. Se observó una secuencia de 29 nucleótidos con homología con el extremo del elemento Mu que coinciden con el inicio de la amplificación dentro del elemento. Ambas secuencias unidas reflejan 3 regiones de homología con la secuencia de *nfnB* de *Escherichia coli*, de 94, 64 y 60 pb. Y se muestra que el elemento *Mud-Cam* se insertó en el extremo del gen que corresponde al carboxilo terminal de la proteína NfnB de *E. coli*.

Este resultado coincide con el gen ya conocido y se asumió que esta cepa porta el *Mud-Cam* dentro del gen *cnr* de *Salmonella*, equivalente al gen *nfnB* de *E. coli*. Figura 7.

Nota: En adelante esta cepa RC1503 se consideró *cnr::Mud-Cam* en los siguientes experimentos y ensayos.

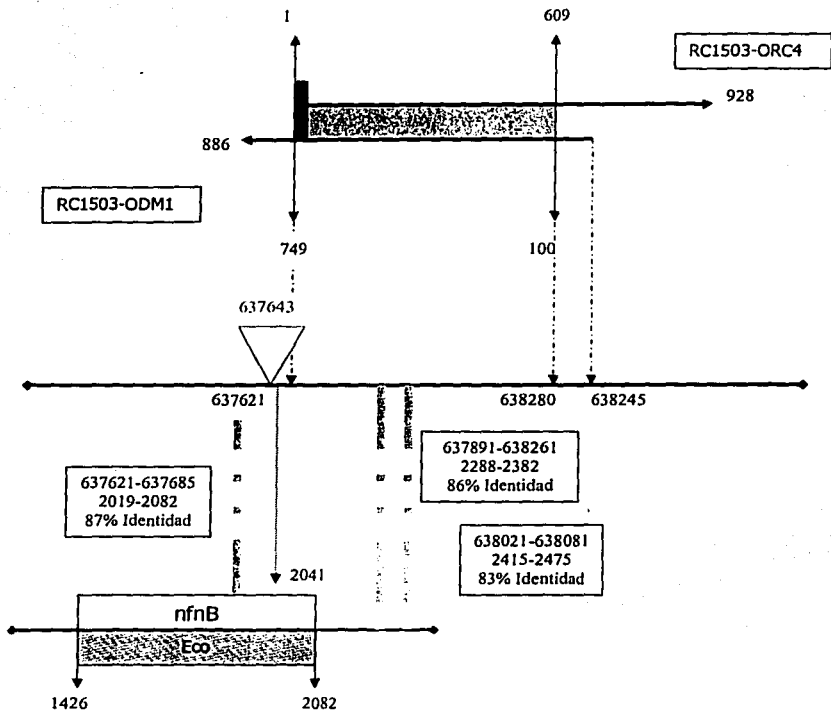


Figura 7. Diagrama de la localización del elemento *Mud-Cam* dentro del gen *cnr* por inferencia en comparación con *nfnB* de *Escherichia coli*.

b. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cepa RC1501.

Se obtuvo una banda amplificada de 1133 pb para la cepa RC1501 con los oligonucleótidos ODM1 y ORC4. El análisis para la búsqueda de motivos con la paquetería GCG reveló que las dos secuencias obtenidas muestran clara homología con el URF (Unidentified Reading Frame – Marco de Lectura no identificado) AE008911 que es la secuencia STM4493 con motivos de transportador ABC (“ATP binding cassette”) del tipo transportador de espermina y putrescina (pequeñas aminas volátiles).

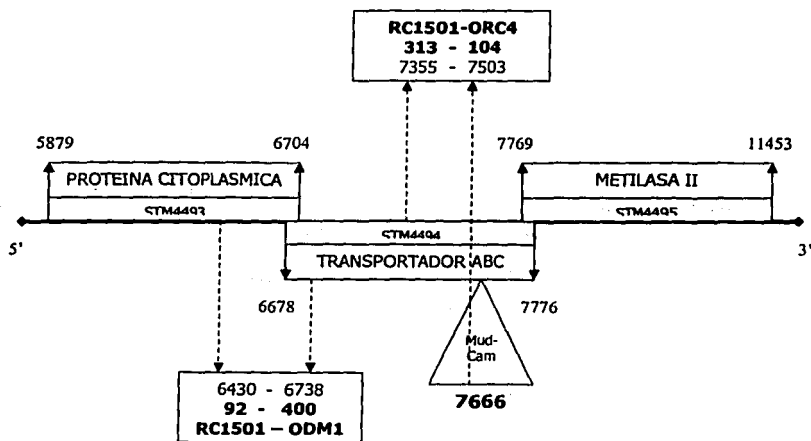


Figura 8. Diagrama de las posiciones de secuencias homólogas a las obtenidas por secuenciación de RC1501 con los oligonucleótidos ODM1 y ORC4 por separado.

c. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cepa RC1506.

Se obtuvo una amplificación de 550 pb para la cepa RC1506 con los oligonucleótidos ORC4 y ORC10. La secuencia obtenida a partir de ORC10 resultó 90% idéntica a una sección del gen *nfsB* de *Salmonella typhimurium* LT2. Sin embargo pequeñas secuencias (8-4 pb) RC1506-ORC4 se encuentran distribuidas también en la secuencia RC1506-ORC10, sugiriendo una amplificación reiterativa de la región. Es muy probable que el oligonucleótido ORC4 haya alineado cercano al ORC10 y que gracias a que en la región existen corridas de a, t o g, es muy probable que el producto amplificado sirviera de templado en las siguientes amplificaciones hasta alcanzar los 550 pb observados. Los análisis BLAST permiten suponer que el transposón *Mu* α -Cam de RC1506 se localiza dentro del gen *nfsB*, observación apoyada por el fenotipo Nf resistente. El que en la primera aproximación mediante la amplificación con oligonucleótidos para *nfnB* y los extremos de *Mu* no mostrara un fragmento amplificado es explicable por la posición de los oligonucleótidos en *nfnB* y la inserción cercana del elemento *Mu* α -cam que no permitió distinguir el producto de amplificación. Figura 9.

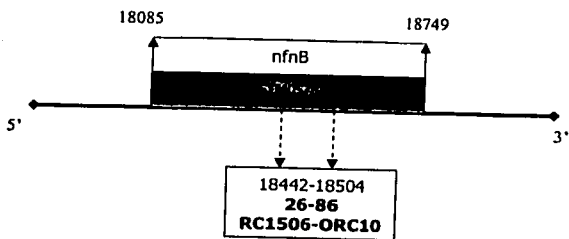


Figura 9. Diagrama de la posición de la secuencia obtenida con RC1506-ORC10 homóloga a la región central del gen *nfnB* (*cnr*) de *Salmonella typhimurium*.

C. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para las Cepas Candidatas.

Con el objeto de agrupar los candidatos por fenotipo se determinó el CMI de cada una de las cepas. En este ensayo se utilizaron 4 cepas como controles. Tabla 6. La doble mutante se construyó mediante transducción de la inserción de RC1503 en RC1378, portadora de la inserción *snrA*::T-POP generando a RC1517 *snrA*::T-POP *nfnB*::Mud-cam (*cnr*::Mud-cam).

Ya que las nitroreductasas reportadas se encuentran clasificadas como oxígeno insensibles, existe la posibilidad de aprovechar este ensayo se distinguir su sensibilidad al oxígeno.

Tabla 5. Cepas utilizadas como control en el ensayo de determinación de la CMI.

Mutaciones	Cepas	Marcador
wt	RC1	
<i>cnr</i> ^r	RC1503	Cm ^R
<i>snrA</i> ^r	RC1378	Tc ^R
<i>snrA</i> ^r <i>cnr</i> ^r	RC1517	Cm ^R TC ^R

Tabla 6. Resultados del ensayo de determinación de la CMI.

Cepas	5 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	20 mg/ml	40 mg/ml	40 mg/ml
	Nf O ₂	Nf O ₂ -	Nf O ₂	Nf O ₂ -	Nf O ₂	Nf O ₂ -	Nf O ₂	Nf O ₂ -
RC1	+	+	-	-	-	-	-	-
RC1378	+	+	+	+	-	+	-	-
RC1517	+	+	+	+	+	+	+	+
RC1501	+	+	+	+	-	-	-	-
RC1502	+	+	+	+	-	-	-	-
RC1503	+	+	+	+	-	-	-	-
RC1504	+	+	+	+	-	-	-	-
RC1505	+	+	+	+	-	-	-	-
RC1506	+	+	+	+	-	-	-	-
RC1507	+	+	-	-	-	-	-	-

Símbolos ; (+) Crecen, (-) No crecen, (O₂) En presencia de oxígeno y (O₂-) En cámara de anaerobiosis.

Todos los candidatos, con excepción de RC1507 presentaron una respuesta similar resistiendo 10 mg/ml de nitrofurantoína. Cabe la posibilidad de que en una búsqueda entre 10 y 20 mg/ml se puedan observar diferencias entre las cepas candidato. Hay que tener en claro que una respuesta (en este caso de resistencia a un antibiótico) similar no implica que las vía(s) metabólica(s) mutadas y/o su(s) componente(s) tengan que ser necesariamente las mismas.

La cepa RC1507 presenta el mismo nivel de resistencia que la cepa silvestre, indicando que esta cepa no es un buen candidato para rastreo de nuevos genes relacionados con la resistencia la nitrofurantoína, y es probable que las segundas mutaciones se hayan perdido al ser transducida la inserción a un fondo silvestre.

La cepa doble mutante sobrevivió en el cuádruple de las dosis que resistieron las cepas con cada una de las nitroreductasas

mutadas independientemente. Lo que nos indica de que la actividad de cualquiera de las dos nitroreductasas con respecto a la nitrofurantoína, es sustituida por la que permanece activa en la célula.

En este primer tamiz solo fue posible eliminar del grupo de estudio a la cepa RC1507.

IX. DISCUSION.

A. Sobre el mapeo por PCR semi-aleatorio

El mapéo por PCR semi-aleatorio con los oligonucleótidos degenerados se hizo procurando cubrir todas las combinatorias posibles en la mezcla de reactivos para cada cepa y cada temperatura. Esta búsqueda fue amplia y se prefirió a la opción de iniciar la búsqueda en condiciones estándar (amortiguador de concentración media y 55°C).

En cambio la búsqueda con oligonucleótidos procedentes del homólogo de *cnr* en *E. coli* llamado *nfnB* dio resultados favorables permitiendo identificar dos de las cepas como portadoras del elemento Mud-Cam dentro del gen *cnr*. Mientras que el oligonucleótido ODM1, diseñado a partir de la nitroreductasa en *Escherichia coli* permitió la amplificación para la cepa RC1501. Esto conduce a que en un futuro la preferencia en la selección de oligonucleótidos se haga con los diseñados a partir de zonas homólogas entre las nitroreductasas, aun cuando no procedan de organismos procariontes.

B. Sobre el transportador dependiente de energía ABC.

El hallazgo de un URF con motivos de transportador transmembranal ABC asociado con la resistencia a la nitrofurantoína en esta tesis es lógico. Ya que una estrategia de las bacterias Gram-negativas es que, además de tener una membrana externa como barrera de permeabilidad también presentan transportadores dependientes de energía que activamente exportan moléculas de drogas que pasan a través de la barrera –ya que las barreras solo hacen mas lenta la entrada de los compuestos y por tanto deben funcionar junto con sistemas de exportación activos-, a menudo utilizando bombas de exportación de múltiples drogas. En bacterias Gram-negativas, estas bombas de una amplia especificidad interactúan con otros canales de la membrana externa y proteínas accesorias, formando complejos que expulsan la droga desde el espacio periplásmico hacia el medio. Este se considera un mecanismo general de resistencia a drogas (Nikaido, 2001).

Los transportadores ABC son conocidos como el sistema de transporte periplásmico dependiente de la unión a proteína en bacterias Gram-negativas, como el género *Salmonella* (Higgins, 1992).

C. Sobre la determinación de la concentración mínima inhibitoria en las cepas candidatas.

Este ensayo permitió correlacionar la presencia del transposon *Mud-Cam* inserto al azar con el fenotipo resistente a la nitrofurantoína en 6 de las 7 cepas candidatas. Así como la diferencia observada en la cepa control *srrA*- que demuestra una mayor resistencia en anaerobiosis.

X. CONCLUSIONES

1. Se relacionó el URF STM4494 con motivos de transportador dependiente de energía tipo ABC (con cassette de unión a ATP) interrumpido con un transposón Mu α -Cam con el fenotipo resistente a la nitrofurantoína de la cepa *Salmonella entérica* serovar Typhimurium RC1501.
2. Las cepas RC1503 y RC1506 fueron identificadas como portadoras del elemento Mu α -Cam dentro del gen *cnr*, codificante de la nitroreductasa menor.
3. La cepa RC1507 presentó un nivel de resistencia a la nitrofurantoína parecido a la cepa Silvestre. Por lo que no se considera resistente y no deberá ser utilizada como cepa candidata en experimentos subsecuentes.

XI. PERSPECTIVAS.

A. En el mapeo del sitio de inserción de transposones.

Recientemente se ha reportado un método de un solo paso que permite la identificación del sitio de inserción de transposones en el genoma de *Salmonella* por medio de la secuenciación directa usando DNA genómico de alta pureza y un oligonucleótido interno del transposón. El protocolo involucra la adición de dimetilsulfóxido y Betaina para reducir las estructuras secundarias. Este método promete ser rápido, barato y eficiente (Qimron *et al*, 2003).

B. En la investigación del transportador ABC.

La localización del transposón interrumpiendo el gen del transportador ABC involucra un paso inicial en su estudio.

Los pasos a continuación que deben ser realizados son:

- Investigar si el gen del transportador es expresado
- Investigar el patrón de expresión del gen
- En ensayos de cinética enzimática probar la existencia de actividad nitroreductora en células completas y en células lisadas de la cepa RC1501.

Con estos datos esperamos investigar que la importancia de este gen y su relación con la resistencia a la nitrofurantoína en *Salmonella entérica*.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Berg, C.M. & D.E. Berg.1996. Transposable element tools for microbial genetics. P. 2588-2612. En F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umbarger (ed.) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Vol. 2. Capitulo 140. American Society for Microbiology. 2a. edicion. Washington, USA.
2. Burgos, R.M., Espinosa-Aguirre, J.J. & R. Camacho-Carranza. 2002. Rastreo de genes asociados con resistencia a la nitrofurantoína en *Salmonella enterica*. Cartel presentado en el XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. Puerto Vallarta, Mexico.
3. Bushman, F.2002. Lateral DNA Transfer: Mechanisms and consequences. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. QH452.3.B87.
4. Carroll, C.C., Warnakulasuriyarachchi, D., Nokhbeh, M.R. & I.B. Lambert. 2002. *Salmonella typhimurium* mutagenicity tester strains that overexpress oxygen-insensitive nitroreductases nfsA and nfsB. *Mutation Research* **501**(1-2):79-98.
5. Castilho, B.A., Olfson P. & J. Casadaban.1984. Plasmid insertion mutagenesis and lac gene fusion with mini-Mu bacteriophage transposons. *Journal of Bacteriology* **158**: 488-95.
6. Craig, N.L.1996. Transposition. P. 2339-2362. En F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umbarger (ed.) *Esc*
7. *herichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Vol. 2. Capitulo 124. American Society for Microbiology. 2a. edicion. Washington, USA.
8. Drlika, K.2001. A strategy for fighting antibiotic resistance. *American Society for Microbiology News* **67**:27-33.
9. Farrel, D.J., Morrissey, I., De Rubeis, D., Robbins M., & D. Felmingham.2003. A UK multicentre study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. *Journal of Infection* **46**:94-100.

10. Gao, N., Ni, Y., Thornton-Manning, J.R., Fu, P.P. & R.H. Heflich. 1989. Mutagenicity of nitrofurantoin and furazolidone in chinese hamster ovary cell strains. *Mutation Research* **225**:181-187.
11. Gulati, D., Hope, E., Mounce, R., Russell, S., & K. Poonacha. 1997. Nitrofurantoin. *Environmental Health Perspectives*. Suplemento 1. **105**:329.
12. Hamer, L., DeZwaan, T.M., Montenegro-Chamorro, M.V., Frank S.A. & J.E. Hamer. 2001. Recent advances in large scale transposon mutagenesis. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**:67-73.
13. Hughes, D. 2003. Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. *Nature Reviews* **4**:432-41.
14. Haapa, S., Taira, S. Heikkinen, E. & H. Savilahti. 1999. An efficient and accurate integration of mini-Mu transposons in vitro: a general methodology for functional genetic analysis and molecular biology applications. *Nucleic Acids Research* **27**(13): 2777-84.
15. Ibarra-Viniegra, A.S., Espinosa-Aguirre, J.J. & R. Camacho-Carranza. 2002. Nitroreductasas bacterianas: especificidad y variabilidad. Cartel presentado en el XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. Puerto Vallarta, Mexico.
16. Liu, S.L., Hessel, A. & K.E. Sanderson. 1993. The XbaI-BlnI-CeuI genomic cleavage map of *Salmonella typhimurium* LT2 determined by double digestion, end labelling and pulsed-field electrophoresis. *Journal of Bacteriology* **175**(13):4104-20.
17. Nikaido, H. 2001. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Cell & Developmental Biology* **12**:215-23
18. Nokhbeh, M.R. Boroumandi, S., Pokorny, N., Koziarz, P., Paterson, E.S. & I.B. Lambert. 2002. Identification and characterization of SnrA, an inducible oxygen-insensitive nitroreductase in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA1535. *Mutation Research* **508**(1-2):59-70.
19. Normark, B.H. & S. Normark. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* **252**:91-106.
20. Maisnier-Patin, S., O.G. Liljas, L. & D.I. Anderson. 2002. Compensatory adaptation of the deleterious effect of antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* **46**:355-66.

21. Paterson, E.S., Boucher, S.E. & I.B. Lambert.2002. Regulation of the nfsA gene in *Escherichia coli* by SoxS. *Journal of Bacteriology* **184**(1):51-8.
22. Porwollik, S., Mei-Yi, R. & M. McClelland. 2002. Evolutionary genomics of *Salmonella*: gene acquisitions revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(13): 8956-8961.
23. Purohit, V. & A.K. Basu. 2000. Mutagenicity of nitroaromatic compounds. *Chemical Research in Toxicology*. **13**(8):673-92.
24. Qimron, U., Madar, N., Ascarelli-Goell, R., Elgrably-Wess, M., Altuvia, S. & A. Porgador. 2003. Reliable determination of transposon insertion site in prokaryotes by direct sequencing. *Journal of Microbiological Methods* **54**:137-140.
25. Rappleye, C.A., & J.R. Roth.1997. A Tn10 derivative (T-POP) for isolation of insertions with conditional (tetracycline-dependent) phenotypes. *Journal of Bacteriology* **179**(18):5827-34.
26. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & T. Maniatis.1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2da. Edicion. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. USA.
27. Sastry, S.S. & R. Jayaraman.1985. Inhibitors of nitrofurantoin reduction in *Escherichia coli*: evidence for their existence, partial purification, binding of nitrofurantoin in vitro, and implications for nitrofurantoin resistance. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **236**(1):252-259.
28. Schmieger, L.1971. A method for detection of phage mutants with altered transducing activity. *Molecular and General Genetics* **410**:378-381.
29. Sengupta, S., Rahman, S., Mukherjee, U., Basak, J., Pal, A.K. & S.N. Chatterjee.1990. DNA damage and prophage induction and toxicity of nitrofurantoin in *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* cells. *Mutation Research* **244**:55-60.
30. Tocher, J.H.1997. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. *General Pharmacology* **28**(4):485-487.
31. Watanabe, M., Ishidate, M. & T. Nohmi. 1990. Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductase gene. *Nucleic Acid Research* **18**:1059
32. Wu, T.T.1966. A model for tree-point analysis of random general transduction. *Genetics* **54**:405-510.

33. Whiteway, J., Koziarz, P., Veall, J., Sandhu, N., Kumar, P., Hoecher, B. & I.B. Lambert.1998. Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of nfsA and nfsB in development of resistance to 5-nitrofurantoin derivatives in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **180**(21):5529-39.
34. Yamada, M., Espinosa-Aguirre, J.J., Watanabe, M., Matsui, K., Sofuni, T. & T. Nohmi.1997. Targeted disruption of the gene encoding the classical nitroreductase enzyme in *Salmonella typhimurium* Ames test strains TA1535 and TA1538. *Mutation Research* **375**(1): 9-17.
35. Zasloff, M.2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **413**:389-395.
36. Zenno, S., Koike, H., Tanokura, M. & K. Saigo.1996. Gene cloning, purification, and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar in biochemical properties to FRase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*. *Journal of Biochemistry* **120**(4):736-44.

XIII. ANEXO

A. Herramientas biológicas utilizadas en la construcción de las cepas RC1501-RC1507.

Se describen algunos atributos de las herramientas biológicas que fueron utilizados en este trabajo.

a. Transposones derivados de fago Mu.

1. Transposón *Mud*-Cam (2.9 kpb, un Elemento Simple de Resistencia a Cloramfenicol).

Mud-Cam no incluye secuencias *lac* y contiene un determinante simple de resistencia a cloramfenicol colocado entre las orillas del fago Mu. Esto puede ser usado como un elemento transposable independiente para hacer mutaciones y tiene un valor especial como un vector para colocar una inserción simple de resistencia a cloramfenicol en el sitio de una inserción conocida de fusión *lac*. Porque este elemento comparte suficiente homología con las orillas de *MudA*, *MudB*, *MudF*, *MudJ* y *MudK*, éste puede ser usado como donador en cruza de transducción en las cuales el marcador seleccionado *CamR* reemplaza a las secuencias *lac* y *KanR* (o *AmpR*) de otros elementos. Debería ser posible,

en principio el usar este elemento como un intermediario cuando se convierte una inserción por fusión de genes a una inserción por fusión de operones (aunque esto no se ha hecho.) (Altman *et al*, 1996).

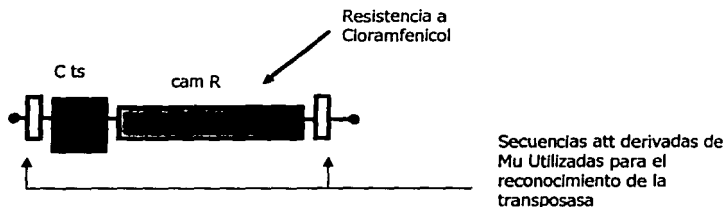


Figura 1A. Mapa abreviado del transposón $Mu\alpha$ -Cam (2.5 Kpb)

2. Transposón MudJ (11.3 kpb, Fusiones de Operón) y MudK (9.7 kpb, Fusiones de Genes).

MudJ y MudK son construcciones originales KanR mini-Mud de Casadaban y colaboradores. Estos contienen deleciones de las funciones de transposasa por lo que para transponerse requiere un aporte externo de transposasa (Altman *et al*, 1996).

3. Derivados del transposón Tn10.

Aunque el elemento Tn10 ha sido ampliamente usado en su forma original, su uso ha sido superado por elementos que

tienen la ventaja de un tamaño menor y de que su estabilidad es por remoción de la actividad de la transposasa. El elemento original Tn10 (9.3 kpb) incluye copias flanqueantes de IS10 que son capaces de transponer independientemente. Aunque la transposición del transposón entero no es un problema para análisis genético, los elementos de las secuencias de inserción (IS) transponen demasiado frecuentemente y causan una elevación significativa de la frecuencia de mutación. (Altman *et al*, 1996).

4. Transposón Tn10 α -Tet.

Tn10 α -Tet tiene un tamaño de 2.9 kpb. Difiere del elemento original por dos mutaciones de delección, cada una de las cuales remueve la mayor parte de los elementos IS10 y se extiende dentro de la región central. El elemento modificado no codifica a la transposasa pero tiene una secuencia repetida IS10 de orden inverso en cada orilla, proveyendo así sitios en los cuales la transposasa puede actuar. Aunque la transposasa debe ser agregada para llevar a cabo la transposición, las mutaciones por inserción son completamente estables en ausencia de un recurso externo de transposasa (Altman *et al*, 1996).

5. Transposon T-POP.

Es un elemento derivado de Tn10 con deleciones dentro del elemento que presumiblemente remueve las señales de terminación de la transcripción. La inserción del elemento Tn10d (T-POP) dentro de un operón interrumpe el gen blanco y hace la expresión de genes distales dependiente de la inducción de la transcripción "hacia afuera" por la tetraciclina. T-POP (Tn10dTet[del20,del25]) es llamado así porque confiere resistencia a la tetraciclina y utiliza un sistema divergente promotor-operador-promotor para proveer de expresión a los genes adyacentes. Por manipulaciones similares, se construyó un segundo elemento mutante doble que porta la misma deleción en el extremo tetR (del20) en combinación con una diferente deleción en el extremo tetA (del26), y se le designó T-POP2 (Rapple y Roth,1997).

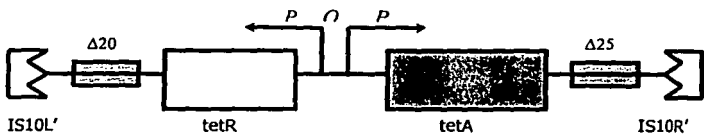


Figura 2A. Mapa abreviado del transposón T-POP.

b. Generalidades del bacteriófago P22.

Es un miembro del bien estudiado grupo de los fágos lambdoides. Su organización genética es similar a la de lambda, con genes de función relacionada agrupados en el mapa genético. Porque esta organización en "cassette" y porque hay homología considerable entre el ADN de los dos fágos, se pueden hacer híbridos P22-lambda muy fácilmente.

P22 tiene un durmiente-inactivo circular y un mapa lineal del prófago. El mapa lineal del prófago tiene su origen en el hecho que P22 (como lambda) lisogeniza vía integración sitio específica dentro de la continuidad del cromosoma huésped en un sitio *ataA*, cerca a *proA*. Este sitio también está presente y se usa en *E. coli* (donde es llamado *attP22*), es más probable dentro del gen *thrW* que codifica un ARNt de treonina. Los P22 lisógenos pueden ser inducidos, en células RecA+ por luz UV o agentes radiomiméticos, con el consecuente corte mediado por RecA- en el represor *cI* dando lugar al desarrollo de fago lítico (Altman *et al*,1996).

B. Metodos.

- a. Cepas bacterianas – Todas las cepas del género *Salmonella* son derivados de *Salmonella typhimurium* LT2. El elemento Tn10dTet es un derivado deficiente en transposición derivado del transposón Tn10 en el cual el gen de la transposasa y las orillas internas de IS10 han sido eliminadas. El elemento MudJ es un derivado deficiente en transposición derivado del fάgo Mu descrito por Castilho *et al* (1984) codificando resistencia a la kanamicina.

- b. Medios de cultivo – Medios complejos fueron el medio nutriente (NB: 0.8% Difco Laboratories) suplementado con NaCl (0.5%) y el medio Luria-Bertani. Medio mίnimo fue Vogel-Bonner con glucosa (0.2%) como fuente de carbono. Los antibiόticos fueron agregados a las siguientes concentraciones; kanamicina, 50 μg/ml; ampicilina, 100 μg/ml para mantener plάsmidos multicopia con determinantes de resistencia; cloramfenicol, 40 μg/ml El medio sόlido fue preparado por la adici3n de agar (1.5%; Difco) al NB, LB o medio mίnimo.

- c. Tέcnicas genέticas – Las cruzas transduccionales fueron hechas mediante el fάgo mutante con alta frecuencia de transducci3n generalizada P22 HT105/1 *int-201* (Schmieger, 1971) Las transductantes seleccionadas de una colonia aislada fueron purificadas y checadas como libres de fάgo al ser sembradas en cajas de medio

verde, seleccionando solo las colonias claras. Fueron sembradas cruzando una línea del fago H5 (mutante de P22) para checar la sensibilidad, seleccionando a las sensibles (asumiendo que, al ser infectadas por otro fago estas ya no contienen ningun fago transductante activo).

- d. Selección de mutantes con T-POP resistentes a la Nitrofurantoína – A partir de una cepa de *Salmonella* portadora de F' y este, a su vez, portador del elemento T-POP se hicieron lisados P22 HT y con este se transfecto a una cepa de *Salmonella* contenedora del plasmido pK101 que genera una transposasa mutante (procedente de Tn10) que permite eventos de transposicion al azar, y ya que el plasmido F', que es original de *E. coli*, no recombina con el cromosoma de *Salmonella* y la transposasa que reconoce las secuencias IS10 del T-POP y lo inserta al azar en el cromosoma, así puede ser transduccionalmente heredado solo por transposición. Se seleccionan las colonias resistentes a la Tetraciclina (~100,000) –portadoras del T-POP - y con ellas se genera un pool de inserciones. Se genera fago HT en esta población y el pool de fagos se asume como representante del mismo número de inserciones al azar e independientes. Con estos lisados se transduce la cepa silvestre de *Salmonella* afinando la selección por replica de placa a las colonias resistentes a 10 µg/ml de Nitrofurantoína (rango de resistencia observado en mutantes para *snrA*), para así ligar la

presencia de la inserción (reportado por la resistencia a Tc) al fenotipo resistente al nitrofurano.

Las transductantes TcR NfR libres de fago, se utilizan como donadoras en la generación de otro pool de fagos HT y así sus inserciones son nuevamente transducidas a la cepa silvestre para garantizar el 100% de cotransducción de TcR con NfR (para asegurar que son 2 fenotipos resultado de una sola inserción). Figura 3A.

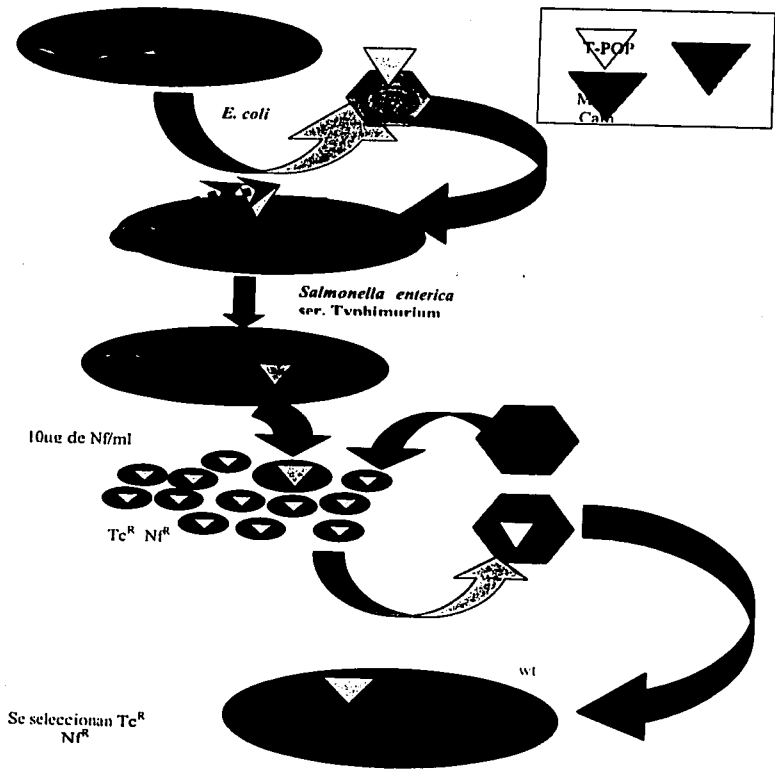


Figura 3A. Diagrama de la selección de mutantes portadores de T-POP resistentes a Nitrofurantoína.

e. Determinación de la orientación y posición de la inserción del elemento T-POP en el gen *snrA* –A estas nuevas cepas resistentes a la Nitrofurantoina y a la Tetraciclina se les practica un mapéo por restricción con XbaI-BlnI-CeuI, etiquetado de extremos y electroforesis de gel de pulso basado en Liu *et al*/(1993). En el ensayo por restricción con XbaI, T-POP contiene un sitio de restricción XbaI y se sugiere en la cepa RC1378 la posición del T-POP en dos posibles sitios: minuto 19.75 o 23.13. Sabiendo que el gen *snrA* esta en el minuto 19, se amplifica con un oligonucleótido dirigido a *snrA* y otro a un extremo de T-POP. El producto de PCR generado es reamplificado y corrido en agarosa. La banda es recortada y purificada con el equipo de extracción "QIAquick gel". La secuencia generada confirma la inserción del T-POP delante del codón 60 de *norA* de *Salmonella* (ortologo de *nfnA* de *E. coli*). Este dato se confirmó con mapéo por transducción y por ensayos de PCR y secuenciación de los productos de la amplificación de ORC4 que se dirige hacia afuera de Mu y que se localiza a partir del nucleótido número 37 de Mu contado por el extremo 3'.

f. Generación de la colección de fagos P22 HT con amplia representación del genoma de *Salmonella* – La cepa *Salmonella* con *Mud1* inserto en *hisG* (hot spot para inserciones de *Tn10*) fué infectada con lisados conteniendo *Mud-Cam* insertado al azar. Se generan lisados esperando que el fago contenga *Mud-Cam* y los genes AB de transposasa localizados en una orilla de *Mud1* que permitan la transposición al ser infectados en una cepa *Salmonella* receptora $\Delta his-$ (para evitar zona de homología y el hot spot).Figura 4A.

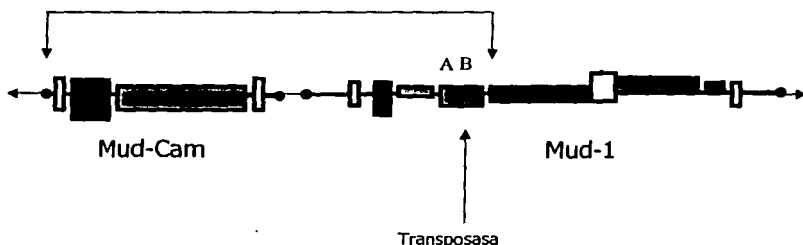
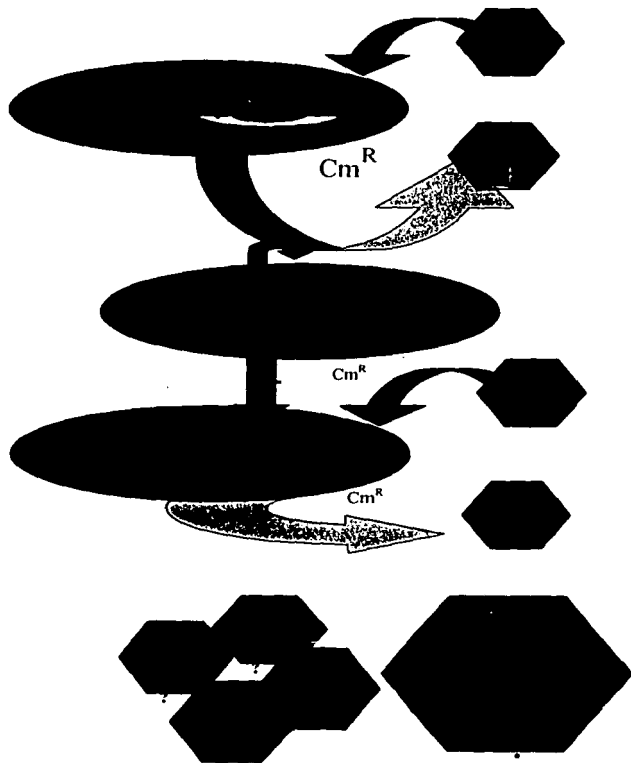


Figura 4A. Diagrama de la zona transducida por el fago P22HT conteniendo los genes codificantes de la transposasa de *Mud-1*.

Así en la célula infectada por el fago contenedor de esta zona, la transposasa generada en *cis* se transpondrá en una zona cualquiera y se seleccionan las colonias transfectantes por su resistencia a Cloramfenicol.

Un lisado P22 fue preparado en este pool esperando que contenga el *Mu* α -*Cam* rodeado de secuencias procedentes de todo el genoma. Es decir generar grandes albercas de eventos de inserción del elemento *Mu* α -*Cam* al azar. Figura 5A.



Se seleccionan las cepas resistentes a Cloramfenicol.

Figura 5A. Diagrama de la generación de una alberca de inserciones en fágos P22 contenedores del elemento *Mud*-Cam rodeado de secuencias al azar.

- g. Transducción de la colección de *Mud*-Cam a la cepa con *snrA* inactivado, seleccionando mayor resistencia a la nitrofurantoina que en las cepas parentales- Con la alberca de eventos de inserción de *Mud*-Cam rodeado de secuencias al azar del genóma de *Salmonella* se transfirió a la cepa contenedora del T-POP en *snrA*. Se seleccionaron transductantes CmR TcR. Las cepas resultantes son seleccionadas para una resistencia a una dosis de 25 mg/ml de Nitrofurantoina (un nivel de resistencia mayor a la de la cepa mutante *snrA*-). Un lisado de P22 es preparado en las cepas candidatas y usado para transducir cepas del tipo silvestre LT2, esperando que la homología entre la secuencia circundante del *Mud*-Cam y el cromosoma del huésped favorezca la recombinación y la inserción del transposón en este. Figura 6A.

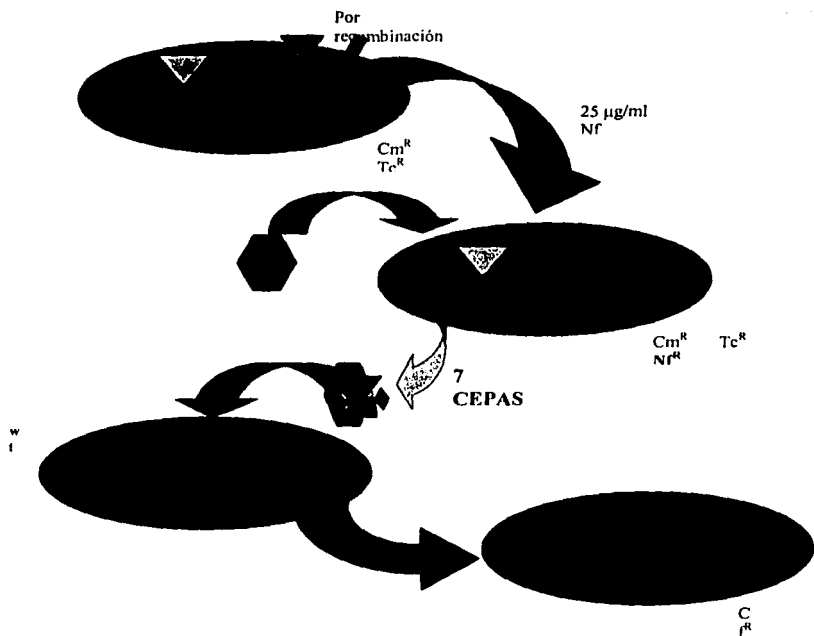


Figura 6A. Diagrama de la transducción de la alberca de inserciones *Muα-Cam* con secuencias al azar en la cepa *snrA-*, selección de cepas resistentes a una mayor dosis de Nitrofurantoina y transducción a un fondo fresco (cepa silvestre).

Tabla 4. Cepas utilizadas en el presente trabajo y sus características

CEPA	GENOTIPO	METODO DE CONSTRUCCION	CEPA RECEPTORA	CEPA DONADORA	COMENTARIOS
RC1	Sty(LT2) wt				Cepa silvestre.
RC1378	Sty(LT2) nsrA::T-POP2	Transducción	RC1	RC1233	La inserción genera resistencia a 15 ug/ml de Nitrofurantoína. La inserción T-POP se ubica en la posición +181 de snrA después del codon 60.
RC1233	Sty(LT2) zzz-::TPOPII	Transducción	RC1	T-POP pool	Resistente a 25 ug/ml de Nitrofurantoína.
RC1503	Sty(LT2) nfnB-::Mud-Cam	Transducción	RC1	Mud-Cam pool	La inserción genera resistencia a 20 ug/ml de Nitrofurantoína (inserción original en RC1378 y Tx a RC1). La inserción de Mud-cam se localiza entre el aminoácido 13 y 14 en nfnB de Salmonella.
RC1509	W3110/pBR322	Electroporación	W3110	pBR322 de RC1480	
RC1510	W3110/pAJ102	Electroporación	W3110	pAJ102 de RC1374	
RC1517	Sty(LT2) nfnB-::Mud-cam nsrA-::T-POP2	Transducción	RC1378	RC1503	Doble mutante. Nitroreductasa menos.
RC1518	sty(LT2) his9533(DEL QGDGBHAFIE) cob-fla+recD561del mutS1965(del) nsrA-::T-POP2	Transducción	RC822	RC1517	Porta la disrupción de snrA.
RC1528	Sty(LT2) zbd-::MudJ	Transducción	RC1503	MudJ pool	MudJ esta ligado a nfnB-::Mud-cam
RC1529	Sty(LT2) nfnB-::Mud-cam snrA-::T-POP2/ F'254 gal+ zzf-1833::Tn10d-kan	Conjugación	RC1517	RC1520	El F'254 complementa para nfnB de <i>Escherichia coli</i> .
RC1530	Sty(LT2) nfnB-::Mud-cam snrA-::T-POP2/ F'147 gal+ zzf-1833::Tn10d-kan	Conjugación	RC1517	RC1521	El F'147 complementa para snrA de <i>Escherichia coli</i> .
RC1501-RC1507	Sty(LT2) zzz-::Mud-Cam	Transducción	RC1	Mud-Cam pool	La inserción genera resistencia a 20 ug/ml de Nitrofurantoína (inserción original en RC1378 y tx a RC1).
RC1508	Zzz-::T-POP2	Transducción	RC1501	RC1378	Resistente a 50 mg/ml de Nitrofurantoína.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

GRACIAS A MI *ALMA MATER* LA UNIVERSIDAD

GRACIAS A MIS EXCELENTES PROFESORES

GRACIAS POR SACIAR MI SED DE CONOCIMIENTO .

GRACIAS POR SEMBRAR EN MI

Por mi raza hablará el espíritu.

Tucson, USA., a 23 de Octubre de 2003