



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

**FACULTAT DE CIÈNCIES  
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I  
MICROBIOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE  
MUTAGÉNESIS Y POTENCIA  
MUTAGÉNICA DE QUINOLONAS**

*Autor : Blgo. José Guillermo González Cabeza*

**BELLATERA – BARCELONA**

**JULIO, 2004**



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**FACULTAT DE CIÈNCIAS  
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I MICROBIOLOGIA**

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE  
MUTAGÉNESIS Y POTENCIA  
MUTAGÉNICA DE QUINOLONAS**

**Memoria presentada por:  
José Guillermo González  
Cabeza, para optar al Grado  
Académico de Doctor en  
Biotecnología, por la  
Universidad Autónoma de  
Barcelona**

**V<sup>o</sup> B<sup>o</sup> del Director de Tesis**

**Dra. Montserrat Llagostera Casas**

*A mis padres, Pedro y Angela*

*A Jacque y Pedro*

## *AGRADECIMIENTOS*

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo se ha realizado en el Departamento de Genética y Microbiología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona, bajo la dirección de la Profesora Dra. Montserrat Llagostera Casas, a quien deseo expresar mi sincero agradecimiento por todo lo brindado, y que conjuntamente con el Profesor Dr. Jordi Barbé García tuvieron la gentileza de hacerme participe del grupo de investigación que ellos dirigen.

Expresar a la vez, mi gratitud, a todos los miembros del Dpto. de Genética y Microbiología, sobre todo a los del Laboratorio 2 y 1 con quienes me ha unido una especial y singular amistad con cada uno de ellos y decirles que aunque nos pueda llegar a separar más de 14000 Km de distancia, siempre estarán en mi memoria; GRACIAS Anna (mi engreída,...todo mi “cariño” para ti), Elenita (...siempre muy simpática), Isabel (...esperamos tenerte por mucho tiempo), Jesús (un estupendo tipo,...suerte amigo), José Antonio (te deseo el mejor de los éxitos), Lorena (...suerte en todo), Mirle (...por los Ames y los *soxRS*), Montse Bosch (“la Bosssccchh”,....una excelente persona), Montse Rebollo (¡ehhh...!, ¡cuidado con los dedos durante el juego!), Pilar (...por el apoyo en los “*moa*” y muchas cosas más), Ricardo (“¡¡óyeme chico...!!”,...espero volver a verte), Susana (...siempre acelerada con el cigarro del medio día), Vanesa (aunque despeinada,... una guapa “brujilla” de Tamarite), Anna Hervás, Gerard (...un buen chico), Jordi, Marc, Mónica, Noelia (“hola Noelia”...), Nuria (...a seguir adelante), Susana. Del mismo modo, hago extensivo este agradecimiento a los miembros del Grupo de Ecología Microbiana; a Elia, Isabel, Jordi Más, María José, Marc, Mayra, Nuria Bigues, Nuria Tomas, Olga, Toni.

Mi agradecimiento a dos personas muy especiales, no sólo por su profesionalismo, sino además porque siempre me mostraron su amistad incondicional, me refiero a Joan y Toni (y claro está, a Nuria), gracias amigos, no sólo a nombre mío sino también el de Jacque y Pedro.

Asimismo, a Julio, Alicia, Vanesa, Enric, Julio Jr., Merce y Juan, quienes han sido mi familia en estos últimos años. De otro lado, a aquellos que de una u otra forma han estado conmigo y con quien he compartido muy buenos momentos, gracias Zoraida y Stephan (...extrañare mucho nuestras salidas de fin de semana); Camilo, Beatriz e Isaac (por conocer algo de Colombia),

Aquí me detengo para hacer una mención muy especial; me refiero al más maravilloso de los “viejos”, mi padre, quien a través de su silencio, vivir sencillo y sin dobleces, me ha enseñando tanto y de quien tengo la deuda infinita de seguir aprendiendo;...a mi madre, por haberme apoyado en todo momento; ...a Jacque, por su amor, comprensión y el estar siempre a mi lado a pesar de la distancia; ...a “mi” Pedro, por haber descubierto en él una fuente inagotable de nuevos motivos.

Por último, agradecer a la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) y a la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), por la concesión de la beca que posibilitó estos estudios.

# TABLA DE CONTENIDOS

## **RESUMEN**

### **I.- INTRODUCCION**

1.- QUINOLONAS	2
2.- ESTRUCTURA QUÍMICA	2
3.- CLASIFICACIÓN DE LAS QUINOLONAS	3
3.1.- QUINOLONAS DE PRIMERA GENERACIÓN	4
3.2.- QUINOLONAS DE SEGUNDA GENERACIÓN	6
3.3.- QUINOLONAS DE TERCERA GENERACIÓN	8
3.4.- QUINOLONAS DE CUARTA GENERACIÓN	9
4.- MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS	11
4.1.- DNA GIRASA	11
4.2.- MODELOS SOBRE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS	14
4.3.- OTROS EFECTOS DE LAS QUINOLONAS	18
5.- RESISTENCIA BACTERIANA A LAS QUINOLONAS	20
5.1.- ALTERACIONES EN LAS DIANAS	21
5.2.- ALTERACIONES EN LA PERMEABILIDAD BACTERIANA	23
5.3.- RESISTENCIA POR LOS SISTEMAS DE EFLUJO	24
5.4.- RESISTENCIA MEDIADA POR PLÁSMIDOS	25
5.5.- MUTACIONES ADAPTATIVAS Y RESISTENCIA	26
6.- PROCESOS DE REPARACIÓN DEL DNA	27
6.1.- SISTEMA SOS	27
6.1.1.- REGULACIÓN DE LA RESPUESTA SOS	29
6.1.2.- MUTAGÉNESIS SOS (SÍNTESIS DE TRANSLESIÓN)	31
6.2.- REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS	39
6.3.- LESIONES OXIDATIVAS Y REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES	42
6.3.1.- REGULACIÓN DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES	45
6.3.2.- REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES	53
7.- MUTAGÉNESIS Y QUINOLONAS	56

### **II.- OBJETIVOS** 66

### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS** 62

1.- MATERIAL BIOLÓGICO	63
2.- ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS	66

2.1.- ENSAYO DE RETROMUTACIÓN EN <i>S. enterica</i> Typhimurium	66
2.2.- ENSAYO DE RETROMUTACIÓN EN <i>E. coli</i> WP2	70
2.3.- MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y TAMPONES EMPLEADOS EN LOS SISTEMAS DE ENSAYOS	71
<b>3.- MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GENÉTICA</b>	<b>76</b>
3.1.- CONJUGACIÓN BIPARENTAL	76
3.2.- ELECTROPORACIÓN	77
<b>4.- MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE DNA</b>	<b>82</b>
4.1.- PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO	82
4.1.1.- Maxiextracción	82
4.1.2.- Miniextracción	84
4.2.- PURIFICACIÓN DE DNA CROMOSÓMICO	87
4.3.- ELECTROFORESIS DE DNA	93
4.4.- DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	96
4.5.- AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	97
4.5.1.- Cebadores Empleados	98
4.6.- LIGACIÓN DE DNA	100
4.7.- RECUPERACIÓN Y PROCESAMIENTO DE FRAGMENTOS DNA	101
4.8.- SECUENCIACIÓN DE DNA	107
4.9.- TRATAMIENTO INFORMÁTICO	108
<b>IV.- RESULTADOS</b>	<b>110</b>
1.- REQUERIMIENTOS GENÉTICOS EN LA MUTAGÉNESIS INDUCIDA POR CIPROFLOXACINA	111
1.1.- REQUERIMIENTO DE LA ACTIVIDAD DEL OPERON <i>moa</i>	111
1.2.- REQUERIMIENTO DE LA ACTIVIDAD UvrB	119
1.3.- REQUERIMIENTO DE LA ACTIVIDAD UvrA	125
2.- PRODUCCIÓN DE LESIONES OXIDATIVAS POR LA CIPROFLOXACINA	127
3.- POTENCIAL MUTAGÉNICO DE QUINOLONAS EN CEPAS DE <i>S. enterica</i> Typhimurium y <i>E. coli</i>	132
<b>V.- DISCUSIÓN</b>	<b>138</b>
1.- Requerimientos Genéticos en la Mutagénesis por Ciprofloxacina	139
2.- Lesiones Oxidativas por Ciprofloxacina	144
3.- Potencial Mutagénica de Quinolonas	146
<b>VI.- CONCLUSIONES</b>	<b>150</b>
<b>VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>153</b>

*RESUMEN*

## **RESUMEN**

Dada la importancia clínica de las quinolonas en el control de enfermedades infecciosas y las posibles implicaciones que puede tener el hecho de que estas moléculas sean agentes mutagénicos en bacterias, el presente estudio se ha centrado en profundizar en los mecanismos de mutagénesis, utilizando la ciprofloxacina como molécula modelo, y en determinar el potencial mutagénico de quinolonas de actual uso clínico.

En lo que se refiere a los mecanismos de mutagénesis, se ha demostrado que para la mutagénesis inducida por ciprofloxacina, se requiere que las bacterias posean un sistema de reparación de escisión de nucleótidos (NER) funcional, descartándose que el operón *moa*, el cual codifica genes de biosíntesis de cofactores de molibdeno tenga algún papel en dicha mutagénesis.

Estos resultados corroboran estudios anteriores, los cuales sugerían la participación del sistema NER en dicha mutagénesis, e indican que probablemente otros genes delecionados en las cepas de ensayo de *S. enterica* Typhimurium TA104 y TA2659 distintos del *uvrB*, no deben tener un papel importante en la mutagénesis mediada por las quinolonas.

Por otra parte, se ha demostrado que la ciprofloxacina puede generar alguna especie reactiva de oxígeno, probablemente el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y/o oxígeno singlete produciendo daño oxidativo, el cual no debe de ser preferentemente la lesión 8-oxoG.

El conjunto de estos resultados indica que las quinolonas deben de producir diferentes tipos de lesiones en el DNA de las células bacterianas. Así, la interacción de la molécula de quinolona con el complejo DNA – DNA girasa debe generar un tipo de distorsión análoga a un enlace intercatenario, dando lugar a una lesión premutagénica. Dicha lesión puede ser procesada por el sistema NER y convertirse en una lesión mutagénica sobre la cual actuaría una DNA polimerasa tendente al error, análoga a MucAB y que introduciría una mutación. Este mecanismo de mutagénesis debe ser común a este tipo de moléculas. Por otra parte, los resultados obtenidos en mutantes *soxRS* indican que esta familia de compuestos también introducen lesiones oxidativas,

las cuales deben de ser más relevantes en aquellas moléculas descritas como fototóxicas, como clinafloxacin, lomefloxacin y otras.

Finalmente, y utilizando ensayos de retromutación en *E. coli* y *S. enterica* Typhimurium, se ha demostrado que las quinolonas de cuarta generación clinafloxacin, trovafloxacin y gemifloxacin son las que presentan mayor actividad mutagénica, mientras que levofloxacin y moxifloxacin son las que producen un menor número de revertientes en ambos sistemas de ensayo. El potencial mutagénico de cada quinolona debe de estar relacionado con su estructura molecular, permeabilidad de la bacteria y acumulación de las quinolonas. Así, se relaciona la baja capacidad de mutagénesis de la moxifloxacin en ambos ensayos con la presencia de un grupo metoxi en posición C-8, mientras que la ciprofloxacin es detectada como una molécula de elevada capacidad mutagénica en *E. coli* WP2 / pKM101 y de baja actividad en *S. enterica* Serov. Typhimurium. Es de señalar que la mutagénesis estudiada se manifiesta a dosis de quinolonas inferiores a la CMI de cada molécula en las cepas de ensayo. En atención a estos resultados se discute las posibles implicaciones de la exposición de las poblaciones de patógenos a bajas dosis de quinolonas y se propone este tipo de estudio como clave para el desarrollo de nuevas moléculas de esta familia de antimicrobianos, los cuales deberían presentar una mejor actividad antibacteriana junto a una baja capacidad de introducir mutaciones.

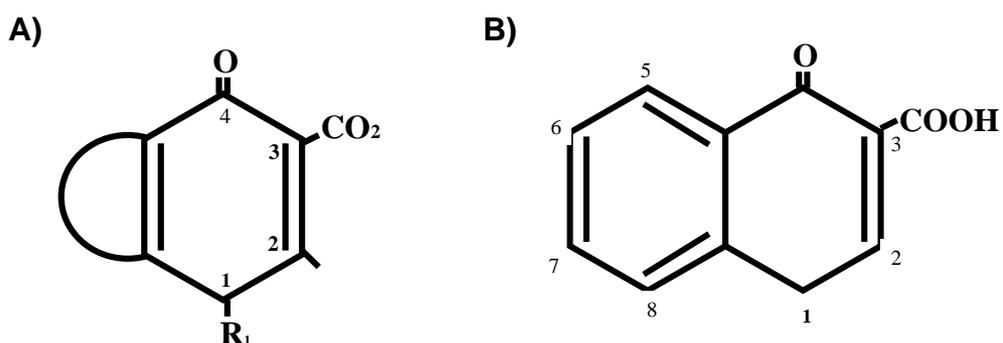
## *I.- INTRODUCCIÓN*

## 1.- QUINOLONAS

Lesher en 1962 durante el proceso de purificación de la cloroquina descubrió de modo fortuito el ácido nalidíxico, el cual fue destinado para el tratamiento de infecciones del tracto urinario; a partir de éste, han surgido un conjunto de compuestos análogos con actividad antibacteriana, también llamados quinolonas, 4-quinolonas, carboxiquinolonas o ácidos quinolona carboxílico (Wolfson y Hooper, 1989; Drlica y Zhao, 1997). La plasticidad del grupo químico central ha permitido la síntesis y ensayo de miles de moléculas distintas de estos compuestos.

## 2.- ESTRUCTURA QUÍMICA

La estructura química básica con propiedades farmacológicas (o farmacóforo) que es común a todas estas moléculas es el anillo piridona, con un sustituyente carboxilado en posición 3; mientras que el núcleo central de la molécula de quinolona es el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, del cual derivan las quinolonas fluoradas y no fluoradas (Wolfson y Hooper, 1989), (Figura 1).



**Figura 1.-** Estructura molecular básica de las quinolonas. **A)** Estructura del anillo de piridona. **B)** Estructura del anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína.

Los estudios químicos revelan que resulta esencial el N-1 del anillo de piridona en la actividad de la molécula, no pudiendo ser reemplazado; mientras que el C-2 admite pocas variaciones. El C-3 sólo puede ser reemplazado por un anillo

tiazolidona fusionado con el C-2; mientras que se tiene poca información sobre variaciones en C-4 (Chu y Fernández, 1989).

El otro componente de la molécula es generalmente un anillo aromático (auxofarmacóforo) con diferentes sustituyentes y que le confiere las características farmacológicas y farmacocinéticas (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

### 3.- CLASIFICACIÓN DE LAS QUINOLONAS

En 1997 se propuso una nueva clasificación de quinolonas que más adelante se fue ampliando con la aparición de nuevos compuestos. Convencionalmente han sido agrupadas por generaciones relacionadas con su época de aparición, estructura química y sobre todo con el espectro antibacteriano. En la Tabla 1 se resume de modo concreto estas características.

**Tabla 1.-** Clasificación de las quinolonas.

Clasificación	Quinolonas (Año de aparición)	Espectro antimicrobiano	Características clínicas
<b>Primera Generación</b>	Ácido Nalidíxico (1962) Cinoxacina Ácido oxolínico Ác. pipemídico (1973) Rosoxacina Flumequina	Organismos Gram negativos (excepto especies de <i>Pseudomonas</i> ).	Infecciones no complicadas del tracto urinario.
<b>Segunda Generación</b>	Norfloxacin (1978) Ciprofloxacina (1987) Ofloxacina (1991) Enoxacina (1992) Pefloxacina Lomefloxacina (1992) Enrofloxacina (uso exclusivo en veterinaria) Fleroxacina	Organismos Gram negativos (incluyendo especies de <i>Pseudomonas</i> ), algunos organismos Gram positivos (incluyendo <i>Staphylococcus aureus</i> , pero no <i>Streptococcus pneumoniae</i> ) y patógenos atípicos.	Infecciones complicadas y no complicadas del tracto urinario, y otras como pielonefritis, enfermedades de transmisión sexual, prostatitis, infecciones de la piel, gastroenteritis y diarrea severa, infecciones nosocomiales.

*continua...*

Clasificación	Quinolonas (Año de aparición)	Espectro antimicrobiano	Características clínicas
<b>Tercera Generación</b>	Levofloxacin(1997) Esparfloxacin(1997) Grepafloxacin (1998) Gatifloxacin(1999) Moxifloxacin (1999)	Igual que para las quinolonas de segunda generación, pero con más actividad frente a Gram positivos ( <i>S. pneumoniae</i> sensible y resistente a penicilina), y frente a patógenos atípicos.	Igual que las de segunda generación, pero además en casos de bronquitis crónica, neumonías intra hospitalarias, neumonías atípicas adquirida en la comunidad de pacientes hospitalizados.
<b>Cuarta Generación</b>	Clinafloxacin Difloxacin Tosufloxacin Trovafoxacin(1999) Sitafoxacin Gemifloxacin	Igual que para las quinolonas de tercera generación, pero con actividad frente a anaerobios.	Igual que las de primera, segunda y tercera generación, en infecciones complicadas del tracto urinario y casos de pielonefritis, infecciones intraabdominales, neumonías nosocomiales e infecciones pélvicas.

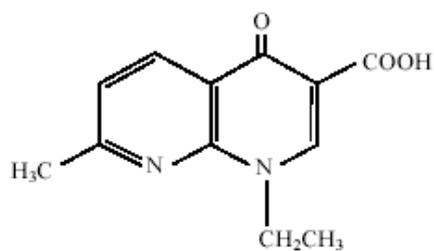
(tomado y modificado de King *et al.* 2000).

### 3.1.- QUINOLONAS DE PRIMERA GENERACIÓN

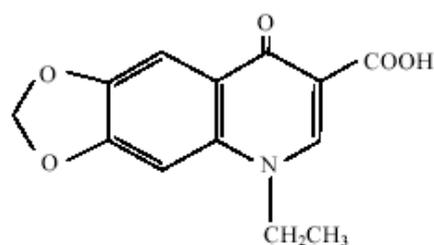
Esta primera generación (Tabla 1) se caracterizó por presentar un reducido espectro de actividad antimicrobiana, sólo fue útil frente a ciertas especies de enterobacterias, y no sobre otras especies de relevancia clínica, como *Pseudomonas*, cocos Gram positivos y anaerobios; razón por la cual, tuvo una aplicación limitada sólo en el tratamiento de infecciones de las vías urinarias, (King, *et al.* 2000). Éstas fueron empleadas hasta finales de los años 1970 (King, *et al.* 2000).

Este primer grupo está representado por el ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cinoxacin, pipemidina y otras que se muestran en la Figura 2 (King *et al.* 2000), Un caso particular lo constituye la flumequina que posee un átomo de flúor; sin

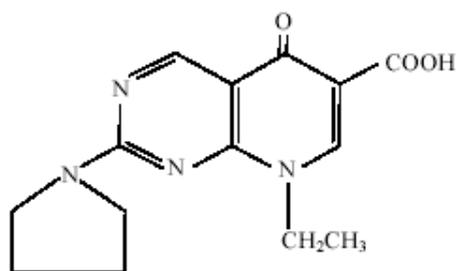
embargo, varios autores han creído conveniente incluirla dentro de esta categoría por sus cualidades farmacológicas (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).



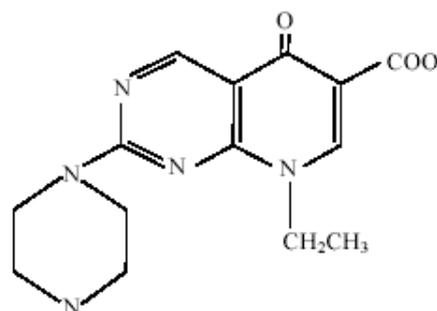
Ácido Nalidíxico



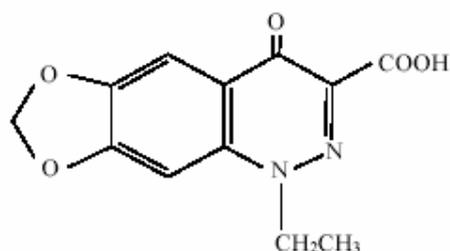
Ácido Oxolínico



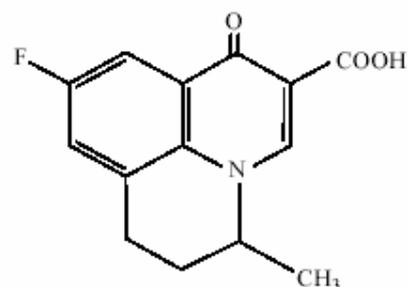
Ácido Piromídico



Ácido Pipemídico



Cinoxacina



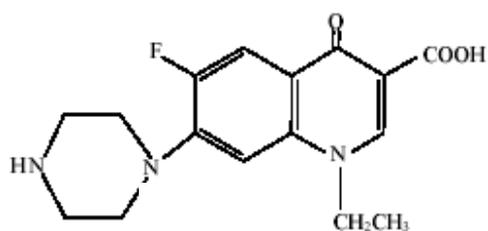
Flumequina

**Figura 2.-** Estructura química de las quinolonas de primera generación.

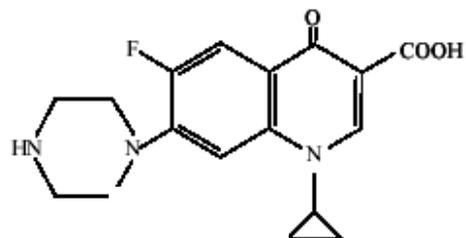
### 3.2.- QUINOLONAS DE SEGUNDA GENERACIÓN

Una década posterior al descubrimiento del ácido nalidíxico, apareció un nuevo grupo, las fluoroquinolonas (FQ); sintetizándose un número mayor de ellas, entre las que se incluye la norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, pefloxacina, enoxacina, fleroxacin, tomafloxacina, lomefloxacina (también clasificada como quinolona de tercera generación), difloxacina y muchas otras (King, *et al.* 2000). La estructura molecular de algunas de ellas se representa en la Figura 3. Este grupo fue empleado durante las décadas 1980 y 1990, llegándose a afirmar que han sido probablemente los antimicrobianos más importantes en la quimioterapia antibacteriana durante dicho período. Estructuralmente difieren de sus anteriores análogos (ácido nalidíxico, ácido oxalínico y cinoxacina) principalmente en dos aspectos. El primero de ellos, es la presencia de un átomo de flúor en posición 6, el cual permite aumentar tanto la afinidad por sus blancos (topoisomerasas tipo II), como la capacidad de penetración al interior de la célula bacteriana (hasta setenta veces con respecto a las quinolonas que no tienen flúor en esa posición (Sumano, 1993); y el segundo, es que poseen un sustituyente piperazinil o pirrolidinil (diamida cíclica) en posición 7 del núcleo quinolónico (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

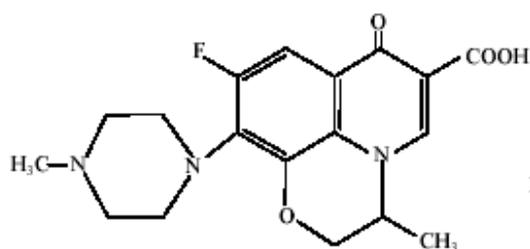
Clínicamente presentan un amplio espectro antimicrobiano, mayor potencia, una disminuida selección de bacterias resistentes, inmejorables propiedades farmacocinéticas, ser menos tóxicas, y tener escasos efectos secundarios. Este grupo presenta actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*, algunas bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y determinadas especies de micobacterias, clamidias, y riquetsias; permitiendo así el tratamiento de infecciones sistémicas (Tabla 1). Sin embargo, su actividad frente a *Acinetobacter* y *S. maltophilia* es moderada y escasa frente a *S. pneumoniae* y a otras especies de *Streptococcus* (King, *et al.* 2000).



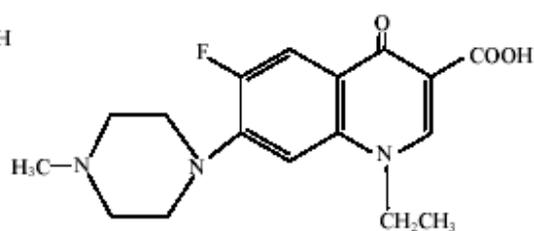
Norfloxacina



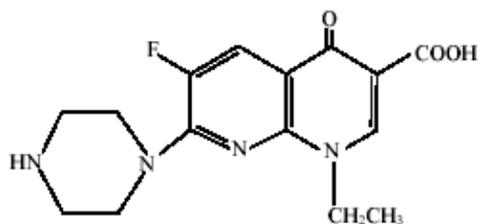
Ciprofloxacina



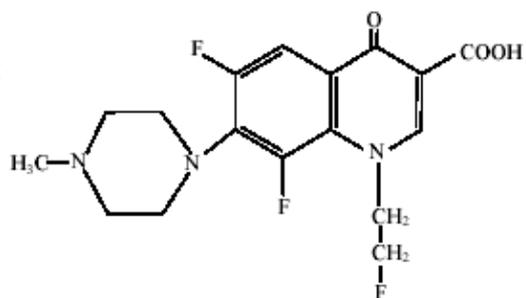
Ofloxacina



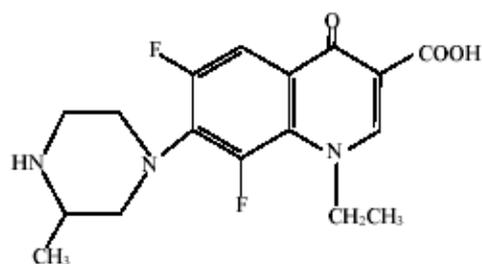
Pefloxacina



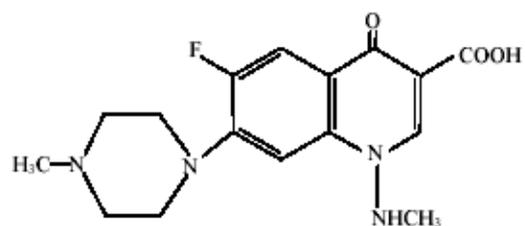
Enoxacina



Fleroxacina



Lomefloxacina



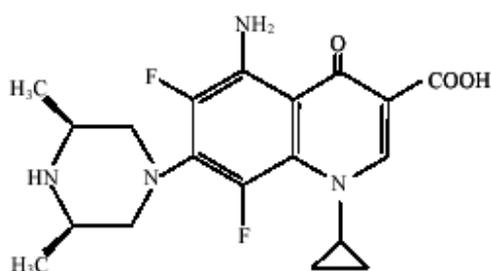
Amifloxacina

Figura 3.- Estructura química de las quinolonas de segunda generación.

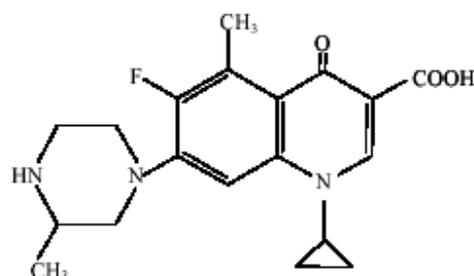
### 3.3.- QUINOLONAS DE TERCERA GENERACIÓN

Las quinolonas de la tercera generación, como esparfloxacina, levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin y grepafloxacin se caracterizan por presentar una mayor complejidad estructural que sus predecesores, por contener sustituyentes fluorados adicionales y otros cambios en posiciones 1, 7 y 8 (Figura 4), mejorando algunas propiedades farmacocinéticas y de espectro antimicrobiano frente a sus análogos de la segunda generación y presentando una mayor actividad ante cocos Gram positivos (Tabla 1) (King, *et.al.* 2000).

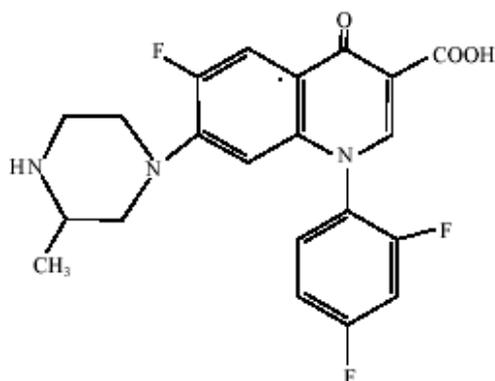
Algunas de ellas han sido retiradas del mercado después de aprobada su comercialización o se ha restringido su uso por sus efectos tóxicos (esparfloxacin, grepafloxacin) (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).



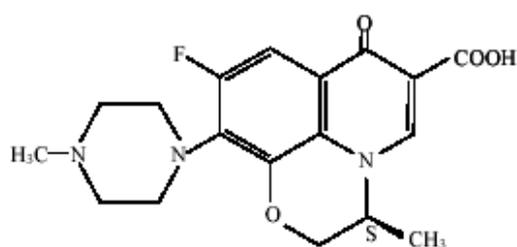
Esparfloxacin



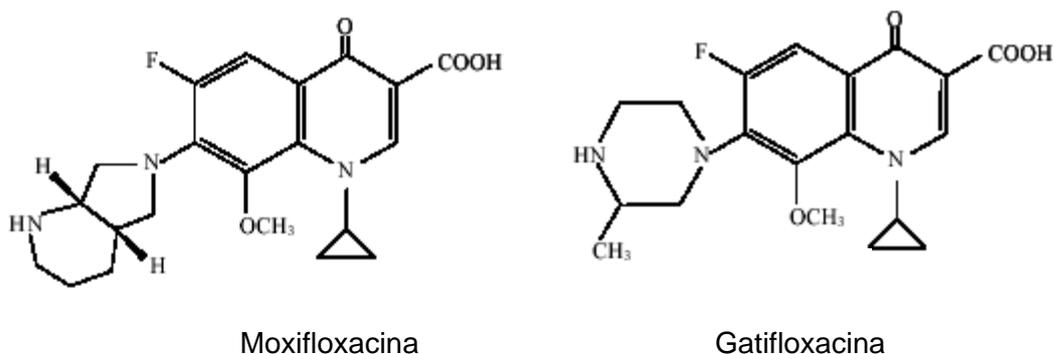
Grepafloxacin



Terafloxacin



Levofloxacin



**Figura 4.-** Estructura química de las quinolonas de tercera generación.

### 3.4.- QUINOLONAS DE CUARTA GENERACIÓN

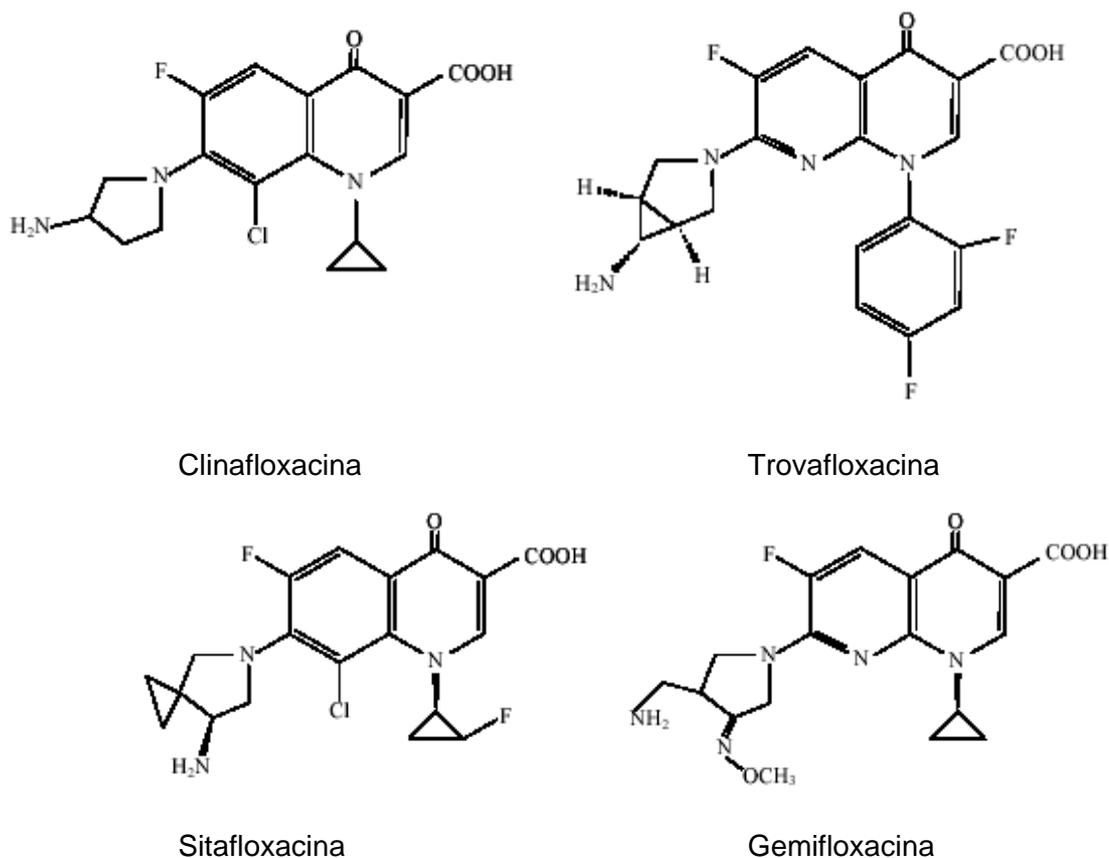
En la actualidad, se vienen sintetizando nuevos compuestos derivados de los señalados anteriormente (Tabla 1) que poseen nuevas propiedades; como la de presentar actividad sobre anaerobios (*Clostridium*, *bacteroides*), abriendo la posibilidad de su uso en infecciones mixtas (King, *et al.* 2000). Por otro lado, algunas de ellas poseen actividad antitumoral, según se ha demostrado en animales de experimentación, lo cual posibilita su futura aplicación en el tratamiento de ciertos procesos tumorales (Tálens-Visconti, *et al.* 2002).

Aún así, estos compuestos siguen siendo polémicos y motivo de una intensa investigación, tanto por lo que se refiere a su aplicación clínica en el tratamiento de enfermedades infecciosas, como porque actúan sobre dianas de procariotas y eucariotas. Entre los representantes de este grupo, se señala a la clinafloxacin, trovafloxacin (retirada del mercado), difloxacin, gemifloxacin, sitafloxacin y tosufloxacin (Figura 5).

Por otra parte, la posibilidad de lograr una mejor actividad a partir de nuevas modificaciones de la estructura no está cerrada, como lo demuestra el desarrollo de las 6-desfluoroquinolonas, las cuales carecen del átomo de flúor en posición 6, el cual se había venido considerando imprescindible para un grado suficiente de actividad. El desarrollo de diversas moléculas dentro de este grupo (garenoxacino y

PGE 9262932, entre otras), con una elevada afinidad por las topoisomerasas se encuentra en fase más o menos avanzada y se asocia a un aumento de actividad *in vitro*, un espectro muy amplio y un reducido potencial de selección de resistencias (García Rodríguez y Muñoz Bellido, 2003).

Desde el punto de vista de la actividad intrínseca, otro ámbito en el que se viene trabajando es sobre los Gram negativos. Las nuevas moléculas desarrolladas mejoran discretamente, en el mejor de los casos, su actividad frente a enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores; aunque de hecho la ciprofloxacina, sigue considerándose la fluoroquinolona de elección frente a *P. aeruginosa*. Conseguir moléculas que además de ser eficaces en Gram positivos, incrementen de forma significativa su actividad frente a Gram negativos, es otro de los objetivos deseables (García Rodríguez y Muñoz Bellido, 2003).



**Figura 5.-** Estructura química de las quinolonas de cuarta generación.

### 4.- MECANISMOS DE ACCION DE LAS QUINOLONAS

En el año 1977 se demostró en *E. coli*, que el ácido nalidíxico inhibía específicamente la DNA girasa, de lo que se dedujo que esta era su diana primaria y funcional. Hoy en día se conoce un amplio rango de especies bacterianas que de igual modo tienen por diana la DNA girasa (Yoshida, *et al.* 1993). Aunque es preciso señalar que también inhiben las actividades de la topoisomerasa IV, cuyas funciones *in vivo* son aún poco conocidas (Wolfson y Hooper, 1989). De modo general, se puede afirmar que la acción de las quinolonas consiste en inhibir la DNA girasa y la topoisomerasa IV (topoisomerasas tipo II) (Drlica y Zhao, 1997; Bearden y Danziger, 2001).

#### 4.1.- DNA GIRASA

Durante el intento de establecer los factores involucrados en la integración del fago  $\lambda$  en el cromosoma de *E. coli*, Gellert y *col.* (1976) descubrieron una enzima que era dependiente de ATP y capaz de introducir superenrollamientos negativos en el DNA, la cual fue denominada DNA girasa (Reece y Maxwell, 1991).

La DNA girasa es una enzima formada por cuatro subunidades: dos subunidades GyrA de 97 kDa cada una, codificadas en el gen *gyrA* (2625 pb), y dos subunidades GyrB de 90 kDa cada una, codificadas en el gen *gyrB* (2413 pb), estando ubicados ambos genes en el minuto 48 y 83, respectivamente del cromosoma de *E. coli* K-12 (Reece y Maxwell, 1991). La masa molecular de la holoenzima es de 374 kDa, formando una partícula globular de 120–150 Å (Reece y Maxwell, 1991) que presenta actividad "DNA - cleavage" (Wolfson y Hooper, 1989; Reece y Maxwell, 1991).

Se requieren ambas subunidades para la plena actividad de la DNA girasa. La subunidad GyrA se une al DNA (en ausencia de la subunidad B), interviene en el corte y unión del DNA a través de la Tyr<sup>122</sup>, formando un enlace transitorio con el DNA cerrado; mientras que la subunidad GyrB posee actividad ATPasa, la cual se ve estimulada por la subunidad A. Cada monómero GyrA presenta una cabeza amino terminal y una cola carboxi proximal. La proteína GyrA es de tipo "hélice–

giro-hélice” (HTH), compuesta por las hebras  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$ , y adopta diferentes topologías para permitir la apertura y el cierre a través del cual debe pasar el DNA (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

La DNA girasa es una enzima esencial para la viabilidad celular, estando involucrada en diversos procesos celulares, (Tabla 2) (Reece y Maxwell, 1991; Aleixandre, *et.al.* 1991; Khodursky, *et al.* 2000; Hooper, 2001). Su principal función consiste en catalizar el superenrollamiento negativo del DNA circular de la bacteria, que es el estado natural en que se encuentra el cromosoma bacteriano; considerando que el DNA debe de situarse en un espacio limitado al interior de la célula, dispuesto en unos 50-80 zonas especialmente organizadas a las que Worcel denominó “enrollamientos” o “dominios” adosados a un núcleo central de RNA y que a la vez estos dominios se hallan formando unos 400 “dominios de superenrollamiento”, cuyas espirales están dispuestas en sentido contrario a la hélice de DNA. (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

**Tabla 2.- Actividades celulares relacionadas con la DNA girasa**

<b>ACTIVIDADES CELULARES EN LA QUE ESTÁ INVOLUCRADA LA DNA GIRASA</b>
Introducción de superenrollamientos negativos en el DNA. Inicio y elongación de la replicación y posiblemente en la terminación. Segregación de los cromosomas replicados. Resolución de estructuras intermedias de DNA entrelazadas durante el proceso de recombinación. Participación en el proceso de transcripción y regulación de promotores dependientes del superenrollamiento del DNA. Participación en procesos de integración fágica y en transposición de algunos transposones como el Tn <sup>5</sup>

*In vitro*, la DNA girasa introduce tales superenrollamientos negativos en el DNA y forma y resuelve nudos en el dúplex de DNA. Todas estas reacciones son dependientes de ATP y requieren un catión divalente, óptimamente Mg<sup>2+</sup> (Reece y Maxwell, 1991), aunque puede ser sustituido por Mn<sup>2+</sup>. *In vitro*, también puede eliminar los superenrollamientos positivos (Reece y Maxwell, 1991) en presencia de un análogo no hidrolizable de ATP (5'-adenilil -  $\beta,\gamma$  - imidodifosfato (ADPNP)) (Wolfson y Hooper, 1989; Reece y Maxwell, 1991). En ausencia de ATP son eliminados los superenrollamientos negativos. El cociente [ATP] / [ADP] determina

el grado final de superenrollamiento, por lo que sería un mecanismo homeostático para controlar el superenrollamiento (Drlica y Zhao, 1997). Esto hace pensar que el enrollamiento puede ser sensible a los cambios energéticos intracelulares y, a la vez, a ciertos parámetros del entorno extracelular, como la concentración de sales, tensión de oxígeno y temperatura; pero no está claro si éstos son efectores directos de la relación  $[ATP] / [ADP]$  (Drlica y Zhao, 1997).

El proceso de superenrollamiento negativo se realiza en varias etapas. El primer paso es la interacción DNA girasa – dsDNA, en la que están involucradas de 120-150 pb (Reece y Maxwell, 1991). Seguidamente, la DNA girasa rompe el DNA y se une covalentemente de forma transitoria a los extremos 5' libres del DNA por medio de la Tyr<sup>122</sup> de la subunidad GyrA. El DNA pasa a través del punto de rotura, lo cual permite que el número de enlace se reduzca en 2. Por último, la rotura del DNA es sellada y la DNA girasa se disocia, lo cual esto está condicionado posiblemente por la hidrólisis de dos moléculas de ATP y, de las dos subunidades GyrB que producirían un cambio conformacional de la enzima (Reece y Maxwell, 1991).

A excepción de los procesos integrativos de ciertos fagos o la transposición de ciertos transposones, las quinolonas inhiben todas las actividades *in vitro* de la DNA girasa y demás reacciones catalizadas por esta enzima en las células bacterianas (Drlica y Zhao, 1997).

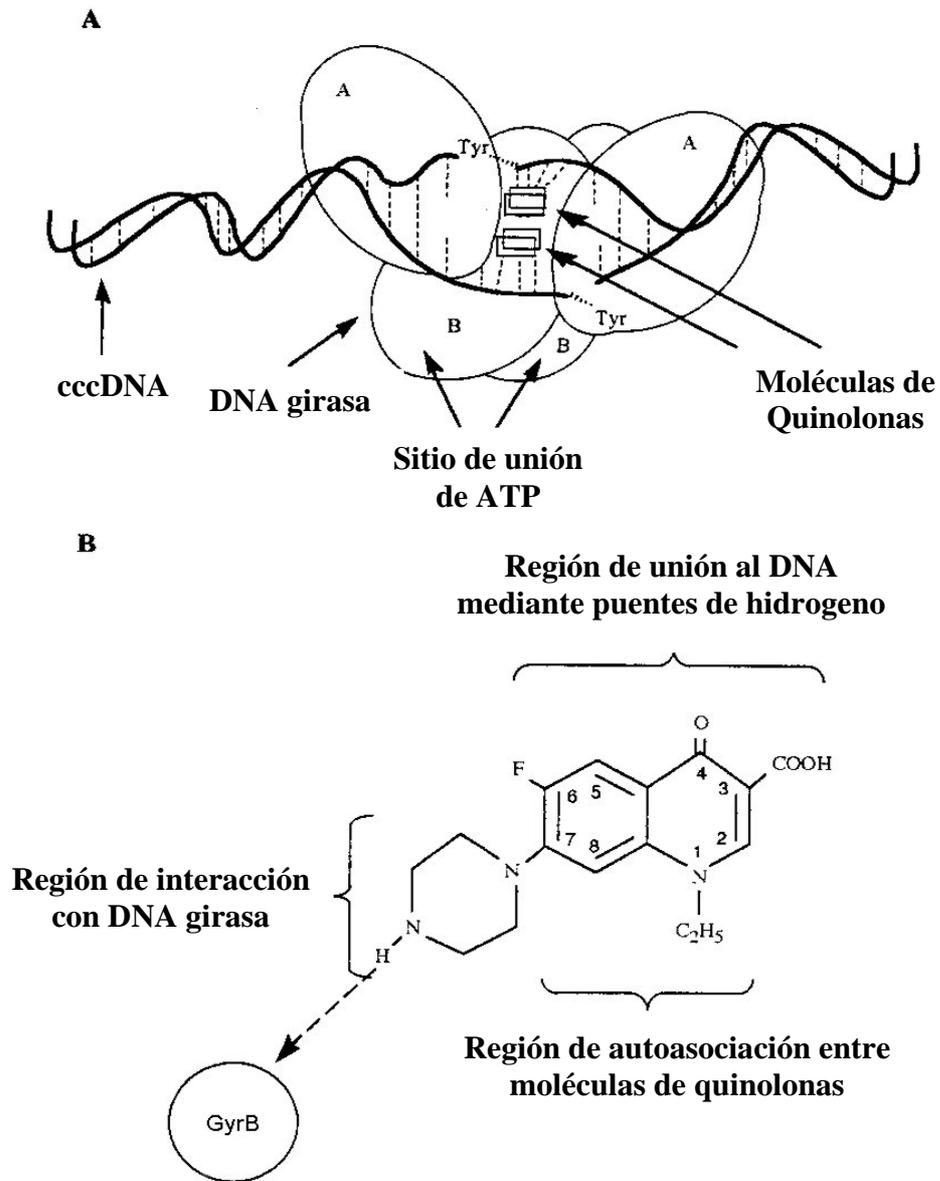
Mutaciones en *gyrA* confieren resistencia a estos compuestos, habiéndose demostrado que la unión de la quinolona es posterior a la ruptura del DNA, debida a la actividad de la DNA girasa; de este modo se impide el giro de la enzima (Reece y Maxwell, 1991). Debido a ello; es que siempre se ha postulado que la DNA girasa es la diana funcional y los monómeros GyrA las dianas primarias, aunque en la actualidad y debido al aislamiento de mutantes *gyrB* resistentes a las quinolonas, se ha cuestionado que la subunidad GyrA sea la única diana primaria de unión de las quinolonas (Wolfson y Hooper, 1989; Drlica y Zhao, 1997; Hooper, 2001).

### 4.2.- MODELOS SOBRE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS

Los primeros estudios señalaron que las quinolonas (ácido nalidíxico) eran incapaces de unirse al DNA, y no fue hasta 1985 que Shen propuso que la norfloxacin se unía al DNA y no directamente a la DNA girasa y que su grado de unión dependía de la topología del DNA. Esta propuesta comportó numerosos trabajos que condujeron a elucidar cual es la diana primaria de estos compuestos: el DNA o la DNA girasa. Actualmente existe el consenso de aceptar que la diana funcional es la DNA girasa y que estos compuestos deben formar una interacción estable con el complejo DNA girasa – DNA para inhibir la actividad de la enzima.

El modelo propuesto por Shen y col. se denominó “unión cooperativa quinolona – DNA” (Figura 6A), el cual propone una inhibición de la DNA girasa de modo indirecto. El principio se sustenta en la generación de un lugar de unión de la quinolona al DNA relajado de cadena sencilla (ssDNA), producto de la rotura del DNA por acción de la enzima. Este corte produciría un desapareamiento de 4 pb, lugar óptimo para la unión de las moléculas de quinolonas a las bases del DNA a través de puentes de hidrógeno, y dichas moléculas se unirían cooperativamente entre sí por un proceso de autoensamblaje (Shen, *et al.* 1989).

Estudios sobre la estructura cristalina del ácido nalidíxico proponen dos posibles tipos de interacción entre las moléculas de quinolonas. Por un lado, posibles interacciones hidrofóbicas cola con cola entre grupos laterales de N-1 y apilamientos  $\pi$ - $\pi$  entre los anillos de quinolonas. Estas interacciones dan lugar a un complejo supramolecular que formaría una unidad consolidada y saturaría el espacio abierto en la molécula de DNA por la DNA girasa, cancelando así los eventos posteriores del proceso del superenrollamiento catalizados por esta enzima.



**Figura 6.- A)** Modelo de unión cooperativa propuesto por Shen y col. para la inhibición de la DNA girasa. **B)** Dominios funcionales que se crearían en el modelo propuesto.

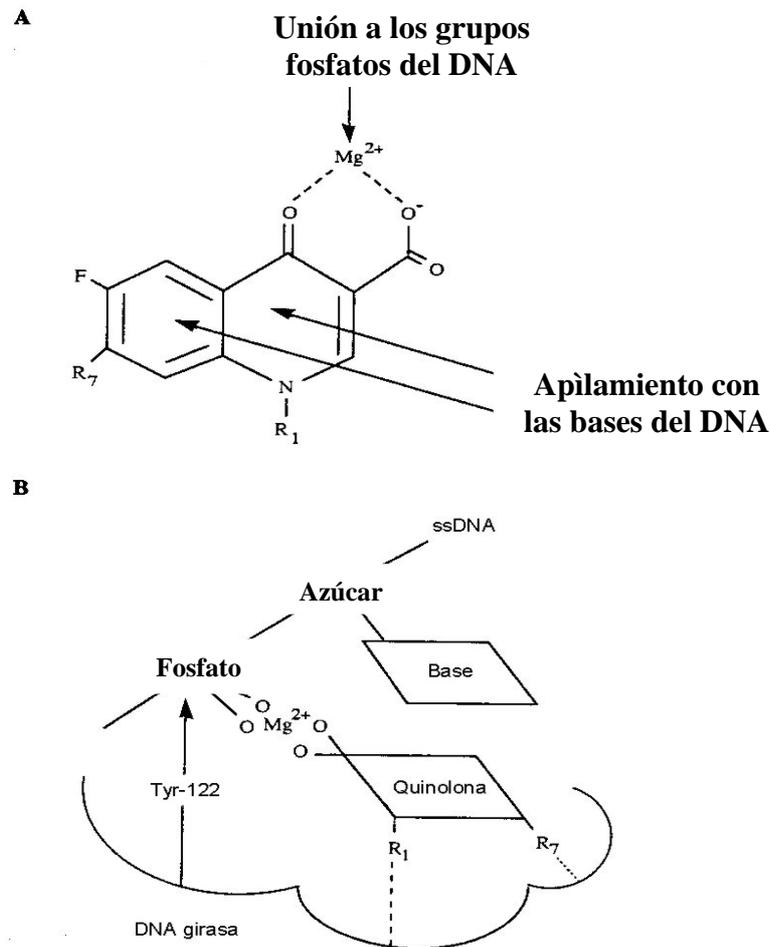
Este modelo, donde la diana primaria es el DNA, parte de los supuestos siguientes: *i)* la topología del lugar de unión generado por la DNA girasa, y *ii)* la capacidad de las moléculas de quinolonas de autoensamblarse y ocupar tales

lugares. En esta propuesta se establecen diferentes dominios funcionales en la molécula de quinolona (Figura 6B): una región de unión al DNA a través de puentes de hidrógeno, una región lipofílica que permitiría la autoasociación de las moléculas de quinolonas y otra región de interacción con la DNA girasa, sugiriéndose que los sustituyentes en el C-7 de la molécula de quinolona podría interactuar con GyrB de la enzima (Shen, *et al.* 1989).

Este concepto de unión quinolona–DNA ha sido ampliado, como fruto de diferentes observaciones sobre la posible modulación del proceso de unión, proponiéndose que las quinolonas no se unen al DNA a través de puentes de hidrógeno, sino a través de  $Mg^{2+}$ , entre sus mitades carbonil y carboxil y los grupos fosfato del DNA, y que no hay autoasociación entre moléculas de quinolonas. Además, las bases de la región de ssDNA interactúan con el sistema planar del anillo de la molécula de quinolona, lo cual estabilizaría el complejo formado. También se ha sugerido que los sustituyentes en el C-7 y en el N-1 podrían estar implicados en la unión de la quinolona a la DNA girasa (Figura 7).

Los dos modelos comentados anteriormente parten de la premisa de que el DNA es la diana primaria de unión de las quinolonas, no obstante no existe un acuerdo general.

Maxwell y col. han propuesto un modelo alternativo (Maxwell, 1992), en el cual la DNA girasa es la diana primaria de las quinolonas, postulando que se requiere tanto la DNA girasa como DNA para que las quinolonas interactúen de forma estable, sustentándose en que la mayoría de mutantes de resistencia presentan cambios en la denominada “Región Determinante de Resistencia a Quinolonas” (QRDR, del inglés “Quinolone Resistance Determining Region”) del gen *gyrA*, lo cual provoca una drástica reducción de la unión de la quinolona (norfloxacin) al complejo DNA girasa–DNA. Además, sugieren que los grupos carboxil del C-3 y oxo del C-4 de las quinolonas se unen por puentes de hidrógeno a las QRDR de la enzima. No obstante otros autores no descartan la participación de ciertos residuos de dicha región como el residuo Asp<sup>87</sup> (Palumbo, *et al.* 1993; Vila, *et al.* 1994; Taléns-Visconti, *et al.* 2002).



**Figura 7.-** Modelo revisado de la unión quinolona - DNA. **A)** Interacción quinolona - DNA a través de iones Mg<sup>2+</sup>. **B)** Modelo molecular de interacción de quinolona con una región ssDNA en el complejo DNA girasa–DNA (Modificado de Palumbo, *et al.* 1993).

Debido a todo lo expuesto, Shen acepta actualmente que el magnesio tendría algún rol en la unión de las quinolonas al DNA y que su modelo no está en contradicción con el hecho de la aparición de cepas resistentes a las quinolonas que presentan mutaciones en los genes *gyrA* o *gyrB*.

Otro modelo es el propuesto por Yoshida y *col.* en 1993 (“quinolone pocket model”), el cual sostiene que las quinolonas interaccionan en la hendidura formada

por el complejo DNA girasa – DNA durante el corte y unión del DNA. La unión estaría determinada conjuntamente por las subunidades GyrA y GyrB y muy posiblemente también por los iones  $Mg^{2+}$ . Este modelo está más acorde con las hipótesis de unión quinolona – DNA girasa, que con los modelos de unión quinolona – DNA.

### 4.3.- OTROS EFECTOS DE LAS QUINOLONAS

La rápida muerte celular que producen las quinolonas, conduce a pensar que dicha muerte sería una consecuencia directa de la inhibición de la DNA girasa. Sin embargo, es complicado discriminar si esta inhibición es directamente responsable de la muerte celular y/o si la inhibición de la DNA girasa es un evento inicial y necesario que desencadena una cascada de procesos que conducen finalmente a la muerte de la célula (Drlica y Zhao, 1997).

Investigaciones *in vitro* e *in vivo* revelan que la concentración de quinolona, requerida para inhibir el superenrollamiento del DNA, es de 10 a 100 veces superior de la que se necesita para inhibir el crecimiento celular. Por ello se supone que no es necesaria una total inhibición de las actividades de la DNA girasa para que se produzca la muerte celular (Hallet y Maxwell, 1991; Drlica y Zhao, 1997). Kreuzer y Cozzarelli propusieron en 1979 la “hipótesis del veneno”; la cual sugiere que la interacción de las quinolonas con la DNA girasa se convierte en un veneno celular, postulando que dicho veneno sería el complejo quinolona – DNA girasa – DNA (Pidcock, *et al.* 1992; Khoudarsky y Kozzarelli; 1998) que actuaría de barrera al paso de las polimerasas, impidiendo así los procesos de replicación y transcripción.

Las quinolonas ejercen una rápida inhibición de la síntesis del DNA. Este efecto por sí sólo no parece ser suficiente para ocasionar la muerte celular, debiendo existir algún otro evento que requeriría síntesis proteica para que ocurra la muerte de la célula. En este sentido, se ha demostrado que tratamientos que inhiben la transcripción y la traducción o la privación de aminoácidos produce una disminución de la actividad bactericida de las quinolonas sin afectar a la inhibición de la síntesis de DNA (Khodursky, *et al.* 2000).

Atendiendo a los factores fisiológicos que se requieren para que las quinolonas ejerzan su acción bactericida, se han descrito varios mecanismos de acción, los cuales varían según la quinolona y el microorganismo estudiado. El Mecanismo A, común a todas las quinolonas, requiere que la bacteria esté en fase de crecimiento y que presente síntesis de proteínas y RNA. Este mecanismo es el único que se ha observado con las quinolonas clásicas (ácido nalidíxico, y ácido oxolínico). El Mecanismo B no requiere que se produzca síntesis de proteínas o RNA para ejercer su acción bactericida, pero necesita que la bacteria se esté multiplicando. Por último, el Mecanismo C requiere que haya síntesis de proteínas y RNA para actuar, pero no hace falta que la bacteria se esté multiplicando. (Clerch. 1995; Tálens-Visconti, 2002).

Otro de los efectos de las quinolonas es su posible acción sobre las superficies celulares. Se ha reportado que concentraciones subletales de quinolonas dan lugar a una distribución irregular de la cápsula de *Klebsiella pneumoniae*, disminuyendo la síntesis del polisacárido capsular K1. Ello podría deberse a una acción directa de las quinolonas o ser una consecuencia de la inhibición de la DNA girasa por alteración de la transcripción de algunos de los genes implicados en la biosíntesis de la cápsula (Drlica, y Zhao, 1997).

En estudios con plásmidos se ha detectado que dosis subinhibitorias de quinolonas conducen a la pérdida de los mismos, habiéndose sugerido que los mecanismos de replicación o de segregación de dichos plásmidos deben ser más sensibles a la acción de las quinolonas que los del cromosoma bacteriano (Reece y Maxwell, 1991).

También se ha descrito que estos compuestos inhiben la conjugación bacteriana y la transferencia del cromosoma bacteriano, estimulan la recombinación no homóloga y aumentan la producción de deleciones en ciertas regiones del plásmido pBR322 integrado en el cromosoma bacteriano (Hooper y Wolfson, 1993).

### 5.- RESISTENCIA BACTERIANA A LAS QUINOLONAS

El empleo de las fluoroquinolonas se ha incrementado notablemente en los últimos años, tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad. Este hecho ha conllevado la aparición de cepas resistentes. Por ello y por su clara aplicación terapéutica es importante el estudio de los mecanismos bacterianos de resistencia, con el objetivo de disponer de procedimientos clínicos adecuados y de diseñar estrategias que minimicen al máximo la resistencia bacteriana emergente. Bajo este contexto, debe valorarse la entrada del compuesto al citoplasma bacteriano, su integración al complejo topoisomerasa – DNA, efectos citotóxicos y finalmente la muerte celular (Fischer, *et al.* 1989; Wolfson y Hooper, 1989; Zhao, *et al.* 1997; Castro *et al.* 1997; Bearden y Danziger, 2001).

La mayoría de las nuevas quinolonas van dirigidas al tratamiento de infecciones respiratorias, por lo que cabe esperar un aumento adicional de su consumo en los próximos años. Al principio de la introducción de las fluoroquinolonas, se pensó que la aparición y diseminación de resistencia sería rara, dada la dificultad de obtener *in vitro* mutantes de *E. coli* resistentes a las fluoroquinolonas tras muchos años de la utilización clínica del ácido nalidíxico o por la ausencia de plásmidos de resistencia a las quinolonas (Fischer, *et al.* 1989; Wolfson y Hooper, 1989; Kojima, 1997; Zhao, *et al.* 1997; Bearden y Danziger, 2001). Sin embargo, la resistencia a las fluoroquinolonas mediada por mutaciones cromosómicas que producen alteraciones en las dianas (topoisomerasas) apareció rápidamente en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; en éstas últimas, lo desarrollaron más rápidamente aquellas que presentaban resistencia a la meticilina, posiblemente debido a una transmisión nosocomial o a la posible co-selección con otros antimicrobianos (Pascual 2003).

Posteriormente, han aparecido cepas de enterobacterias, como *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, resistentes a las fluoroquinolonas, debido fundamentalmente a múltiples mutaciones que disminuyen la afinidad de las dianas por estos compuestos (Fischer, *et al.* 1989; Wolfson y Hooper, 1989; Zhao, *et al.* 1997; Bearden y Danziger, 2001; Pascual, 2003). En el caso de *C. jejuni*, la resistencia en humanos ha aumentado paralelamente a la resistencia en animales, tras la

introducción de las fluoroquinolonas para uso humano y animal. La tasa de resistencia de este microorganismo para la ciprofloxacina en 2002 fue del 82% (Pascual, 2003). Para *E. coli*, la resistencia a las fluoroquinolonas en España, aparece especialmente en pacientes con infecciones del tracto urinario y pacientes neutropénicos con bacteriemia desarrollada durante la profilaxis. Además, la tasa de resistencia a la ciprofloxacina ha aumentado en España de un 4,3% en 1992 al 35% en 2002. Por otro lado, la tasa de portadores fecales de *E. coli* resistentes a las fluoroquinolonas es elevada, incluso en niños que no han estado en contacto con fluoroquinolonas (Pascual, 2003).

La introducción de fluoroquinolonas en los protocolos de tratamientos de infecciones respiratorias, como consecuencia del incremento de resistencia de *S. pneumoniae* a los betalactámicos y otros antimicrobianos, puede producir un aumento de la resistencia a las fluoroquinolonas en este microorganismo, como de hecho se está empezando a describir, por lo que será importante hacer un seguimiento cercano a este posible efecto.

El comportamiento de una fluoroquinolona en relación con la aparición de resistencia, sería la de una fluoroquinolona con una baja capacidad de selección de resistencia y una farmacocinética que le permita mantenerse de forma estable a concentraciones séricas ampliamente superiores a las CMI de los mutantes que pudieran generarse. Desde este punto de vista, es interesante la descripción de algunas nuevas moléculas como DQ113, con una capacidad de selección de resistencia en estafilococos muy inferior a la de otras fluoroquinolonas, WCK771A que presenta una CMI < 1 mg/l frente a estafilococos resistentes a moxifloxacina y levofloxacina o DK 507k activa frente al 100% de los neumococos resistentes a levofloxacina (García Rodríguez y Muñoz Bellido, 2003).

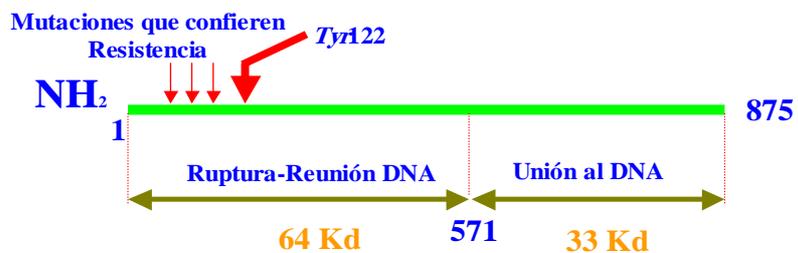
### **5.1.- ALTERACIONES EN LAS DIANAS**

Se dispone de suficiente información para sostener que la causa principal de resistencia de *Escherichia coli* a las quinolonas es debida a mutaciones en la subunidad GyrA (Castro, *et al.* 1997) y en menor grado en la subunidad GyrB de la DNA girasa. La secuenciación del gen *gyrA*, de diversos aislados clínicos

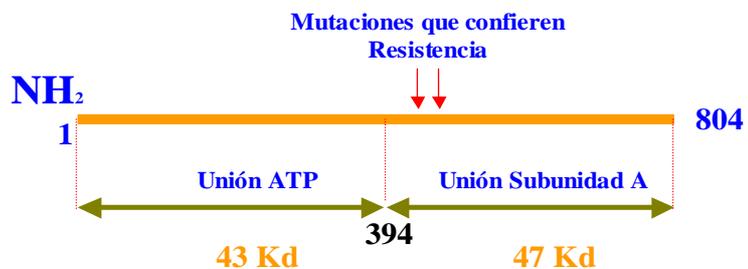
resistentes a quinolonas, revelan que presentan mutaciones concretas en la región amino terminal de *gyrA* cerca del residuo Tyr<sup>122</sup> (región QRDR), el cual es el responsable de la unión covalente de la enzima al DNA (Figura 8) (Fischer, *et al.* 1989; Castro *et al.* 1997; Hooper, 2001).

Entre estas mutaciones, la sustitución en el residuo Ser<sup>83</sup> de la subunidad GyrA de *E. coli* produce una acentuada resistencia a diversas quinolonas (Drlica y Zhao, 1997; Piddock, 2002); estas experiencias nos muestran que la unión del complejo con la enzima mutada es 60 veces inferiores que la unión al complejo con la DNA girasa salvaje. Otras mutaciones en la región QRDR dan lugar a un nivel de resistencia inferior que la debida a cambios en la Ser<sup>83</sup>, entre ellas podemos citar mutaciones en los codones 87, 67, 82 y 106, que pueden a la vez coadyuvar a un aumento de la resistencia (Ozeki, *et al.* 1997; Fischer, *et al.* 1989; Ruiz, *et al.* 2002); ello hace inferir que estos residuos también estén implicados en la unión de la quinolona a la DNA girasa (Mason, *et al.* 1995; Drlica y Zhao, 1997). Estos resultados están de acuerdo con el modelo de inhibición de Maxwell mencionado anteriormente.

### Unidad *GyrA*



### Unidad *GyrB*



**Figura 8.-** Representación esquemática de la estructura de las subunidades GyrA y GyrB de la DNA girasa de *E. coli*, mostrando las regiones involucradas en la resistencia a quinolonas.

Estudios posteriores en *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* han rebatido la idea de que la DNA girasa sea la única diana principal de las quinolonas, ya que la primera resistencia se debe a mutaciones en la topoisomera IV, mientras que mutaciones en la DNA girasa proporcionan un nivel adicional de resistencia (Drlica y Zhao, 1997). De este modo en *S. aureus*, la topoisomerasa IV (cuyas subunidades se conocen como GrIA y GrIB) es la primera diana de las quinolonas (Ferrero, *et al.* 1994; Bearden y Danziger, 2001).

Los mayores aportes al respecto han sido efectuados en *Streptococcus pneumoniae*, los cuales también han revelado que la relación entre estructura y actividad de las quinolonas puede ser diferente para cada especie bacteriana (Khoudursky, *et al.* 2000; Hooper, 2001; Taléns-Visconti, *et al.* 2002). Así, de acuerdo al orden mutacional en las QRDR de la DNA girasa y topoisomerasa IV, los mutantes resistentes de *S. pneumoniae* se pueden agrupar en tres clases. El primer grupo, inicialmente identificado por su resistencia a la ciprofloxacina y también a la levofloxacina, norfloxacina, perfloxacina y trovafloxacina, se caracteriza por presentar mutaciones en la topoisomerasa IV antes que en la DNA girasa, lo que sugiere que *in vivo*, estos fármacos actúan preferentemente sobre la primera enzima. Un segundo grupo de mutantes, compuesto por resistentes a la esparfloxacina, grepafloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina y NSFQ-105 (homólogo a la ciprofloxacina con un grupo 4-4-aminofenilsulfonil-1-piperacínilo en el C-7), presenta mutaciones en la DNA girasa antes que en la topoisomerasa IV, lo que señala a aquella como su diana principal. Finalmente, la clinafloxacina y gemifloxacina actúan sobre ambas dianas, la DNA girasa y la topoisomerasa IV, aunque se generan en primer lugar mutaciones en *gyrA* y *gyrB*, estas mutaciones suceden con bajas frecuencias, lo que indica que ambas contribuyen de forma importante en la acción del fármaco (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

### **5.2.- ALTERACIONES EN LA PERMEABILIDAD BACTERIANA**

Las quinolonas son moléculas hidrofílicas, que atraviesan la membrana externa de bacterias Gram negativas a través de los canales de porinas. Tanto su tamaño como su topología son compatibles para el ingreso de éstas a través de las porinas OmpF y OmpC (Giraud, *et al.* 2000). Se ha sugerido que las moléculas más

hidrofóbicas podrían estimular por sí mismas su difusión a través de la capa de fosfolípidos, gracias a su capacidad de quelación del magnesio, que se halla en la membrana externa estabilizando el lipopolisacárido (Liu y Ferenci, 1998; Giraud, *et al.* 2000).

Se han descrito numerosos mutantes de permeabilidad que modifican la sensibilidad a quinolonas hidrofílicas, aunque la resistencia de dichos mutantes no es muy elevada. Se reporta que mutaciones en los genes *ompF* y *ompC* dan lugar a una escasa o nula resistencia y éstas se caracterizan por presentar variaciones en las concentraciones de las porinas OmpF y OmpC. Paralelamente, mutaciones en los genes *nfxB*, *norB*, *norC*, *nfxC* y *cfxB* parecen estar asociados a una menor permeabilidad a través de los canales OmpF, así como a una menor permeabilidad a otras moléculas como tetraciclina, cloranfenicol o algunos  $\beta$  lactámicos (Wolfson y Hooper, 1989). Por otro lado, mutaciones en los loci *nfx*, *mar*, *cfx* y *sox*, involucrados en la respuesta frente a condiciones medio ambientales adversas, dan lugar a resistencia frente a muchas moléculas diferentes, incluidas las quinolonas. Otras mutaciones, aún no bien caracterizadas genéticamente, se han relacionado de igual modo con bajos niveles de OmpF o de OmpC (Zeller *et al.* 1997).

También se ha postulado que el estado energético de las membranas estaría interviniendo en el transporte de moléculas de quinolonas y por tanto afectando la resistencia. Así pues, la concentración intracelular de norfloxacin es la misma en células salvajes en presencia de desacopladores del transporte electrónico que en mutantes *nfxB*, *cfxB* o *marA* (Cohen, *et al.* 1989).

No existen demasiados resultados concluyentes respecto a las mutaciones que afectan a la membrana externa y se dispone aún de menor información sobre alteraciones en la membrana citoplasmática que pudieran afectar el transporte de dichos compuestos.

### **5.3.- RESISTENCIA POR LOS SISTEMAS DE EFLUJO**

Es creciente el interés por los sistemas de eflujo y su relación con la resistencia a antibióticos. Éstos se caracterizan por expulsar al exterior celular un

considerable número de moléculas, como antibióticos de distintas familias estructurales y en muchos casos antisépticos, biocidas, compuestos aromáticos y detergentes. Entre sus características está su inespecificidad y su ubicuidad, habiéndose descrito en todas las especies bacterianas analizadas (así como en células eucariotas). Una única célula bacteriana puede tener hasta 20 sistemas de eflujo distintos (Sánchez *et al.* 2003).

Uno de los más conocidos es el sistema de transporte denominado AcrAB de *E. coli*, el cual está codificado en los genes *acrAB* y parece tener como función fisiológica la protección de las células frente a sales biliares y ácidos grasos que son tóxicos habituales de su entorno fisiológico. Este sistema se sitúa en la membrana interna de los microorganismos y es un proceso inespecífico y dependiente de energía, ligado a un gradiente de protones. El sistema AcrAB está compuesto por el transportador AcrB y la proteína periplasmática accesoria AcrA. Se cree que AcrA, de forma alargada, aproxima la membrana externa e interna, formando un trímero que interacciona con el monómero AcrB; bombeando así una gran variedad de sustancias, incluida las quinolonas, presumiblemente a través del canal TolC (Sánchez, 2003).

Es importante destacar que la expresión de los genes *acrAB* aumentan de forma considerable en los mutantes Mar (del inglés "multiple antibiotic resistant"), lo que implica que dicho locus en *E. coli*, no solo regula la expresión de la porina OmpF, sino también la expresión de la bomba AcrAB. Mutantes Mar presentan resistencias a quinolonas, debido a una disminución en la permeabilidad de la membrana externa y a una importante expulsión activa a través de la membrana interna (Zeller, *et al.* 1997; Giraud, *et al.* 2000; Weber and Piddock, 2001).

#### **5.4.- RESISTENCIA MEDIADA POR PLÁSMIDOS**

Por el mecanismo de acción de las quinolonas parecía poco probable encontrar mecanismos de resistencia plasmídica a estos antibacterianos. Sin embargo, en 1967, Barbour aisló cepas de *E. coli* resistentes al ácido nalidíxico que presentaban un mecanismo de resistencia codificado en un plásmido.

Posteriormente, también se ha descrito este tipo de resistencia en *Shigella dysenteriae* (Munshi *et al.* 1987).

En los últimos años también se ha señalado tal resistencia en cepas de *K. pneumoniae* de origen norteamericano y en cepas de *E. coli* de origen asiático (Martínez, *et al.* 1998). En estas cepas, se ha asociado su resistencia a fluoroquinolonas con la presencia de un plásmido conjugativo, denominado pMG252. Dicho plásmido contiene el gen *qnr*, que codifica la proteína Qnr, capaz de proteger a la DNA girasa de *E. coli* de la inhibición por ciprofloxacina. Respecto a la topoisomerasa IV, diana secundaria de las quinolonas en *E. coli*, parece ser que no es afectada por dicha proteína; faltando aún por elucidar como es que interfiere en la unión de la quinolona al DNA girasa (Pascual, 2003).

Las cepas de *E. coli* portadoras de este plásmido son susceptibles a la ciprofloxacina, debido a que el gen *qnr* confiere un bajo nivel de resistencia. Sin embargo, no deja de ser interesante que esta nueva característica coadyuve a la adquisición de mutaciones que confieran resistencia. La demostración *in vitro* de la transmisión de este plásmido por conjugación a otras enterobacterias sugiere un posible riesgo de incremento de resistencia a las fluoroquinolonas en el futuro (Pascual, 2003).

### **5.5.- MUTACIONES ADAPTATIVAS Y RESISTENCIA**

Generalmente se ha asociado la resistencia bacteriana a quinolonas a la selección de mutaciones cromosómicas preexistentes en una población bacteriana dada, denominándose a este tipo de sucesos mutacionales “mutaciones relacionadas con el crecimiento”. Junto a ello, cada vez hay más datos sobre otro tipo de sucesos mutacionales que ocurren al exponer las células bacterianas a un proceso selectivo. Este tipo de mutación se denomina “independiente del crecimiento celular” o también “mutación adaptativa”.

Las mutaciones adaptativas se caracterizan porque ocurren en células sin dividirse o dividiéndose lentamente y por estar bajo una determinada presión selectiva. Además, parece ser que solo producen fenotipos que favorecen el

crecimiento de las células en las condiciones selectivas en que se encuentran (Reisenfeld, *et al.* 1997; Janion 2000). Los mecanismos para explicar las mutaciones adaptativas siguen siendo aún desconocidos. No obstante, se sugiere que el diferente espectro mutacional de células en crecimiento y células sin dividirse (mutaciones adaptativas) son un reflejo de actividades diferenciales de los sistemas de reparación (Reisenfeld, *et al.* 1997; Janion 2000).

Experimentalmente se ha descrito la aparición de mutaciones adaptativas *in vitro*, al tratar *E. coli* con ciprofloxacina. Las primeras colonias de mutantes espontáneos en aparecer son probablemente el resultado de mutaciones preexistentes en la población inicial, mientras que las colonias de mutantes que van apareciendo desde unos pocos días hasta aproximadamente un mes de incubación, serían consecuencia de mutaciones adaptativas (Reisenfeld, *et al.* 1997).

### **6.- PROCESOS DE REPARACIÓN DEL DNA.**

En este apartado se tratan con detalle los mecanismos de reparación del DNA que podrían participar en el procesamiento de lesiones producidas por la interacción de las quinolonas con el complejo DNA – DNA girasa.

#### **6.1.- SISTEMA SOS**

Cuando la célula se ve afectada por un gran número y/o calidad de lesiones sobre el DNA que provocan la inhibición de la replicación y escapan a las capacidades habituales de reparación, se activa un conjunto de procesos denominado “respuesta SOS”, el cual ha sido ampliamente estudiado en *E. coli* y otros microorganismos (Bredberg, *et al.* 1989; Howard, *et al.* 1993; Friedberg, *et al.* 1995; Mason *et al.*, 1995; Janion, 2001).

Las quinolonas promueven esta respuesta (Phillips *et al.* 1987; Piddock y Wise, 1987; Ysern, *et al.* 1990; Power y Phillips, 1993), la cual está constituida por aproximadamente 30–40 genes (“genes SOS”) (Tang, *et al.* 1999; Wang, 2001), aunque otros autores a través del análisis computacional sobre la localización de

cajas SOS y el valor del índice de heterología, señalan que son próximos a los 70 genes en el genoma de *E. coli* (MG1655) (Janion, 2001; Fernández de Henestroza, *et al.* 2000). La expresión de dichos genes no es constitutiva, sino inducida por el gran número de lesiones existentes y tienen como objetivo el codificar proteínas involucradas en la reparación del DNA, recombinación, mutagénesis y mantener la viabilidad celular, hasta que el daño haya sido completamente reparado (Pidcock y Wise, 1987).

Los genes que forman el denominado “regulón SOS” pueden estar funcionalmente interrelacionados, aunque no genéticamente ligados. Comúnmente han sido denominados genes “din” (del inglés, damage inducible) (Walker 1987; Bredberg, *et al.* 1989; Howard, *et al.* 1993), los cuales son mayoritariamente cromosómicos, aunque también pueden encontrarse en plásmidos. Estos genes están controlados negativamente por la proteína LexA, la cual es el represor del sistema. Junto al represor LexA, la proteína RecA interviene también en la inducción de la expresión de los genes de este regulón (Howard, *et al.* 1993; Friedberg, *et al.* 1995).

En *E. coli*, el gen *recA* forma parte de un operon monocistrónico, ubicado en una zona cromosómica donde se encuentran genes mayoritariamente “housekeeping” y metabólicos (Horii *et al.* 1981). La proteína RecA codificada en este gen, presenta un masa molecular de 37,8 kDa y está constituida por 352 aminoácidos (Ogawa, *et al.* 1979; Sancar, *et al.* 1980). En ausencia de lesiones, *E. coli* contiene entre 1000–10000 moléculas por célula, pudiendo aumentar en un estado inducido hasta cincuenta veces más (Ogawa, *et al.* 1979; Friedberg, *et al.* 1995).

Son múltiples las funciones de la proteína RecA, siendo las más importantes las siguientes: 1) Participa activamente en los proceso de recombinación homóloga, permitiendo el apareamiento e intercambio intracatenario de cadenas de DNA homólogas. Para ello, se une de manera no específica a regiones de ssDNA y dsDNA en presencia de ATP, formando un nucleofilamento de topología helicoidal (denominado también nucleofilamento o filamento presináptico), a razón de seis monómeros de RecA por vuelta (la estequiometría de unión es de tres pb por cada

monómero de RecA) y con una orientación 5'→3' sobre el ssDNA. Esta estructura constituye la forma activa para el intercambio de cadenas de DNA (Friedberg, *et al.* 1995). 2) Función reguladora de la respuesta SOS, comportándose como una coproteasa (RecA\*), que promueve la autohidrólisis de LexA y de otras proteínas similares. 3) Interviene en los procesos de reparación. 4) Participa en la síntesis de translesión, la cual da lugar a mutaciones.

Aunque se han caracterizado más de 60 genes *recA* de origen bacteriano (Roca y Cox, 1997), todos ellos muestran en común que su producto RecA presenta los siguientes dominios funcionales los cuales están relacionados con los diferentes procesos biológicos en los que interviene: *i)* Dominio de unión a nucleótidos e hidrólisis *ii)* Dominio de unión al DNA. *iii)* Dominio de interacción monómero-monómero e interacción entre filamentos y *iv)* Dominio de interacción con LexA y otras proteínas.

El represor LexA de *E. coli*, codificado en el gen *lexA*, es una proteína de 202 aminoácidos con una masa molecular de 22,7 kDa y capaz de regular negativamente su propia transcripción, así como la del resto de genes SOS (Horii, *et al.* 1981; Piddock y Wise, 1987; Lewin, *et al.* 2001). Datos experimentales señalan que en ausencia de lesiones en el DNA, esta proteína tiene una vida media de una hora, presentando una concentración de aproximadamente 1300 moléculas por célula. En cambio, la hidrólisis de LexA se produce completamente a los 4–5 minutos de haber lesionado el DNA. Estructuralmente LexA presenta tres dominios: *i)* Dominio de unión al DNA (Dominio amino-terminal), *ii)* Dominio carboxi-terminal y *iii)* Dominio conector (“hinge región”).

### 6.1.1.- REGULACIÓN DE LA RESPUESTA SOS

La proteína LexA de *E. coli* ejerce su efecto represor sobre la transcripción de los genes SOS, incluyendo al mismo gen *lexA* y a *recA*. Para ello, reconoce y se une a una secuencia operadora consenso, denominada “caja SOS” (- 5' - TACTG – (TA)<sub>5</sub> – CAGTA – 3'), situada en el promotor o entre éste y la secuencia codificante del gen SOS en cuestión. LexA se une a la región operadora en forma de dímero, lo cual es imprescindible para ejercer su efecto represor (Friedberg, *et al.* 1995). Existe un amplio consenso sobre que primero se une un monómero de LexA a la

mitad de la secuencia operadora, lo que promovería la unión del segundo monómero a la otra mitad de la caja SOS. Es decir, se produce un modo cooperativo de unión, originado por la interacción proteína-proteína entre los dominios carboxi terminales de ambos monómeros (Piddock y Wise, 1987).

La unión de LexA a las distintas regiones operadoras presenta una afinidad diferencial, lo que conduce a una expresión modulada del sistema según la magnitud del daño, a la vez que permite un cierto nivel de expresión basal para el normal funcionamiento celular. Operadores cuya secuencias difieren más de la secuencia consenso señalado anteriormente, son operadores débiles y, por el contrario, aquellos que muestran mayor similitud son operadores fuertemente regulados, como por ejemplo los genes del operon *umuDC*, el gen *sulA* (Friedberg, *et al.* 1995).

La expresión de los distintos genes SOS no sólo depende de la afinidad de LexA hacia las diferentes regiones operadoras, sino que también depende del número de operadores presentes en cada gen SOS. La mayoría de genes SOS sólo presentan un único operador; otros como los genes *lexA*, *cea* y *caa* poseen dos cajas SOS y *recN* tres cajas SOS. Otro factor que también puede modular el grado de represión es la posición de las cajas SOS respecto a los promotores. El conocimiento molecular sobre el modo en que LexA bloquea la actividad de la RNA polimerasa es aún limitado en varios aspectos. No obstante, se asume que por competitividad los represores compiten con la RNA polimerasa y ocupan el lugar del promotor, inhibiendo así la transcripción, o bien bloquean algunos de los pasos posteriores a la unión promotor–RNA polimerasa (Tapias, 2000).

El incremento de la expresión de los genes SOS empieza cuando la replicación del DNA es bloqueada y se acumulan regiones de ssDNA que actúan como señal inductora de la respuesta SOS. Se cree que la proteína RecA reconoce dichas secuencias de ssDNA y formaría un complejo ternario con ssDNA y un nucleósido trifosfato, lo que provocaría un cambio conformacional reversible de la proteína RecA y de este modo, adquiriera la mencionada actividad coproteásica (RecA\*) (Horii, *et al.* 1981). Es de señalar que en el proceso de activación de la proteína RecA. Intervienen otras proteínas, como la proteína RecF, de la cual se

sostiene una coparticipación con la proteína RecA durante su unión a regiones de ssDNA y a la adquisición de su forma activa RecA\*. (Clerch, 1995; Friedberg, *et al.* 1995; Tapias, 2000).

La coproteasa RecA\* interacciona con LexA y promueve su autohidrólisis produciéndose una rotura entre Ala<sup>84</sup> y Gly<sup>85</sup> del dominio carboxi terminal. Se postula que el grupo ε-amino del residuo Lys<sup>156</sup> permite la remoción de un protón de la Ser<sup>119</sup> para conseguir activarla y atacar el enlace peptídico Ala<sup>84</sup> – Gly<sup>85</sup>. Se ha logrado reproducir esta digestión *in vitro* a un pH alcalino sin la participación de RecA. Otra alternativa sugiere que el residuo Lys<sup>156</sup> puede ceder un electrón al grupo α amino cuando la unión peptídica ha sido rota, formando la Ser un éster con el sustrato (Tapias, 2000). De modo similar, RecA\* también promueve la autohidrólisis de ciertos represores de fagos (Drilca y Zhao, 1997).

Según se ha indicado, los primeros genes SOS en expresarse son aquellos que presentan una menor afinidad del represor por la región operadora. Así, en respuesta a tratamientos con agentes mutagénicos débiles, los primeros genes en alcanzar niveles elevados de expresión son el propio gen *lexA* y los genes *recA*, *uvrA*, *uvrB* y *uvrD*. En cambio, aquellos genes fuertemente reprimidos, como *sulA* y *umuDC*, sólo se expresarán a un nivel máximo bajo situaciones de tratamientos mutagénicos fuertes y/o persistentes.

En la medida en que la célula pueda reparar las lesiones, no habrá regiones de ssDNA y no se activará la proteína RecA, con lo cual no tendrá lugar la autohidólisis de LexA y éste podrá de nuevo reprimir los genes del regulón, recuperándose el nivel basal de transcripción (Piddock y Wise, 1987).

### 6.1.2.- MUTAGÉNESIS SOS (SÍNTESIS DE TRANSLESIÓN)

Algunas lesiones pueden persistir en el genoma durante la replicación, especialmente bajo circunstancias en que: *i)* las células contienen una gran cantidad de lesiones, *ii)* una lesión en particular es pobremente reparada, *iii)* regiones genómicas son reparadas deficientemente y *iv)* las lesiones son ocasionadas durante el proceso de replicación (Wang, 2001). Consecuencia de ello,

las células activan un sofisticado proceso de tolerancia, capaz de permitir la replicación sobre el DNA lesionado, denominado “mutagénesis SOS” o “reparación tendente al error” y más recientemente “síntesis de translesión” (Becherel y Fuchs, 1999; Livneh, 2001; Wang, 2001).

En la síntesis de translesión existe un conjunto de actividades génicas a tener en cuenta (genes *umuD<sub>St, Ec</sub>*, *umuC<sub>St, Ec</sub>*, *mucA*, *mucB*, *recA*, *ssb*, *din B*, DNA pol III), donde juegan un papel central las DNA polimerasas de baja fidelidad de copia, de cuyas manifestaciones se tiene conocimiento desde hace varias décadas atrás. Los aportes más significativos han surgido durante los años 1999-2000, producto de haber sido descritas cinco nuevas DNA polimerasas (Pol IV, Pol V en *E. coli* y Pol $\eta$ , Pol $\kappa$ , Pol $\tau$  en eucariotas), las cuales han sido recientemente muy bien caracterizadas (Bacherel y Fuchs, 1999; Wang, 2001; Boudsoe, *et al.* 2002; González y Woodgate, 2002; Vaisman, *et al.* 2002).

Entre los genes que codifican estas polimerasas, unos de los más conocidos son los que se encuentran en el operon *umuDC* (UV mutagenesis) de *E. coli* (*umuDC<sub>Ec</sub>*), formando una única unidad transcripcional (dicistrónico) ubicada en el minuto 26 de su mapa cromosómico y que se halla bajo el control de LexA. Estos genes se encuentran solapados por una adenina (adenina final codificante del codon de terminación de *umuD* y la adenina codificante del codon de iniciación de *umuC*) y codifican dos proteínas con una masa molecular de 15,1 kDa y 47,6 kDa respectivamente (Friedberg, *et al.* 1995). A nivel celular, se hallan aproximadamente 180-200 moléculas de UmuD en el estado no inducido, aumentando hasta 2400 copias sin un represor funcional. En cambio, los niveles inducidos de UmuC pueden alcanzar las 200 moléculas por célula, frente a las aproximadamente 16 moléculas en el estado no inducido; estas concentraciones son suficientes para promover la mutagénesis.

La proteína UmuD tiene la cualidad de presentar gran homología con el represor LexA y al igual que éste, es susceptible de sufrir una modificación postrasduccional, promovida por *RecA*<sup>\*</sup>. La autohidrólisis de UmuD se produce entre los residuos Cys<sup>24</sup> y Gly<sup>25</sup> (González y Woodgate, 2002), la cual da lugar a un polipéptido menor, denominado UmuD' (11,9 kDa), que corresponde al extremo

carboxi-terminal de la molécula. UmuD' es la forma mutagénica activa, es decir la que participa en la síntesis de translesión (TLR = del inglés translesion replication) (Bradley y Walker, 1998). Posteriormente, UmuD' interacciona con la proteína UmuC, formando un complejo multimérico UmuD<sub>2</sub>'C, responsable de la mutagénesis SOS (Friedberg, *et al.* 1995; Bradley y Walker, 1998; Bacher, *et al.* 1999).

En investigaciones iniciales se pensaba que UmuD<sub>2</sub>'C modificaba de alguna manera a la DNA Pol III, reduciendo su capacidad correctora. Sin embargo, Tang en 1999 confirmó que el complejo UmuD<sub>2</sub>'C presenta *in vitro* actividad de DNA polimerasa, introduciendo una elevada tasa de errores durante la incorporación de nucleótidos. En tal sentido, es que ahora se le denomina DNA Pol V, siendo UmuC la subunidad catalítica (Tang *et al.* 1999; Livneth, 2001; Wang, 2001; González y Woodgate, 2002). La DNA Pol V forma parte de una gran familia de DNA polimerasas relacionadas filogenéticamente y a la que recientemente se les ha denominado familia-Y de DNA Polimerasa. Las propiedades bioquímicas de esta familia parecen estar muy conservadas desde bacterias hasta el hombre. La inactivación de TLR por mutaciones en *umuC* produce una modesta reducción en la resistencia de mutagénesis por UV, sugiriendo que la TLR contribuye en algo a la supervivencia. A la vez, en los mutantes *umuC* disminuye fuertemente la mutagénesis debido a agentes que lesionan el DNA (Livneh, 2001; González y Wodgates, 2002).

El operon *umuDC* de *Salmonella enterica* Typhimurium (*umuDC<sub>St</sub>*), se halla ubicado en el minuto 42,2 de su mapa cromosómico (Sanderson, *et al.* 1995), próximo al extremo de la inversión cromosómica (entre los minutos 25 y 35) que altera el orden génico frente a los de *E. coli*. El operon *umuDC<sub>St</sub>* presenta gran similitud con el *umuDC<sub>Ec</sub>*, existiendo una homología de hasta el 71%. Al igual que el de *E. coli*, presenta una caja SOS y una región promotora, aunque se diferencia en que *umuD<sub>St</sub>* y *umuC<sub>St</sub>* no se solapan entre sí como ocurre en *E. coli*, sino que se hallan separados por un dinucleótido (TT) (Rosales, 1998).

De modo similar, determinados plásmidos como el pKM101 de 35 kb (producto de una delección de 14 Kb del plásmido natural R46), tienen la

particularidad de presentar una región, denominada “muc” de aproximadamente 2 Kb, que contiene el operon *mucAB* (del inglés, mutagenesis UV and chemicals), el cual forma parte del regulón SOS. Los genes *mucA* y *mucB* son funcionalmente homólogos a los *umuDC*, están solapados por 13 pb y codificando una proteína de 16 kDa (MucA) y otra de 45 KDa (MucB), respectivamente. Los datos experimentales han establecido actividad DNA polimerasa tendente al error por parte de MucB, la cual ha sido denominada DNA Pol RI (Goldsmith, 2000), aunque para ello requiere MucA', RecA y Ssb; mostrando así, una alta capacidad de replicación sobre sitios abásicos, lesión caracterizada por bloquear seriamente la replicación de las DNA polimerasa I, II y III. La similitud funcional de DNA Pol RI y DNA Pol V es manifiesta por el hecho de que mutantes  $\Delta umuDC$  puedan ser complementados con el operon *mucA'B*.

En la mutagénesis por UV y otros mutágenos se ha comprobado que las proteínas MucAB son más activas que sus homólogas UmuDC, ya sea en *E. coli* como en *S. enterica* Typhimurium (Clerch, *et al.* 1996b; Clech, *et al.* 1996c). Para ello se han propuesto varias hipótesis. Una de ellas postula que posiblemente MucAB sin procesar podría presentar cierta actividad mutagénica, otra propone que la mayor actividad de MucAB es consecuencia de una mayor eficiencia en el procesamiento de MucA a MucA' (por hidrólisis en el enlace Ala<sup>24</sup>-Gly<sup>25</sup>), y una tercera sugiere una mayor afinidad de MucA' por RecA, que UmuD (Clerch, 1995; Rosales, 1998).

Si bien la organización genética de los operones *mucAB* y *umuDC* es similar, ambos operones han experimentado una divergencia evolutiva. Así, las proteínas UmuD<sub>Ec</sub> y MucA sólo presentan el 42% de similitud en la secuencia de aminoácidos, mientras que la homología entre UmuC<sub>Ec</sub> y MucB es del 55% (Friedberg, *et.al.* 1995). Además, las proteínas MucA y UmuD<sub>Ec</sub> o MucB y UmuC<sub>Ec</sub>, no son intercambiables.

Se han identificado otros operones similares a *umuDC* en diferentes plásmidos conjugativos, como el denominado *samAB* (del inglés, Salmonella mutagenesis), el cual se halla localizado en el plásmido críptico pSLT de 60 Mda (Rosales, 1998; Goldsmith, *et al.* 2000) y que difiere en un 40% del operon

*umuDC<sub>St.</sub>*. Estos genes están solapados por un par de bases y codifican proteínas de tamaño similar a los codificados en el operon *umuDC*, conservando SamA el sitio hipotético de rotura Ala<sup>24</sup>-Gly<sup>25</sup>. A diferencia de lo que sucede con UmuDC<sub>St.</sub>, las proteínas SamAB y UmuDC<sub>Ec</sub> no son intercambiables. El operon *samAB* incrementa la mutabilidad en *S. enterica* Typhimurium, únicamente si está presente en un plásmido de alto número de copias. Otro de ellos, es el operon *impCAB* en el plásmido TP110 y el operon *rumAB* del plásmido R391 (Rosales, 1998; Goldsmith, *et al* 2000).

Otro miembro de la nueva familia de DNA polimerasas de baja fidelidad, es la DNA Pol IV, codificada en el gen *dinB* (cromosómico), que también forma parte del regulón SOS. Esta polimerasa juega un papel importante en la mutagénesis de fagos  $\lambda$  irradiados en *E. coli*, produciendo mutaciones en regiones lesionadas del DNA (Livneh, 2001; Wang, 2001). Artificialmente se ha logrado sobreexpresar el gen *dinB* en *E. coli*, lo que es suficiente para activar la mutagénesis en ausencia de lesiones exógenas sobre el DNA, produciendo deleciones (-1 pb) y consecuentes corrimientos en el marco de lectura (Wagneri y Nohmi, 2000; Livneh, 2001).

De otro lado, la TLR puede ser dividida en dos categorías, *i*) TLR libre de error que incorpora nucleótidos correctos opuestos a la lesión evitando de esta forma mutaciones, *ii*) TLR propenso al error que, contrario al caso anterior, incorpora nucleótidos erróneos produciendo mutaciones. Frente a estas posibilidades y según las evidencias bioquímicas *in vitro*, resulta complicado efectuar la distinción entre la TRL libre de error y la TRL tendente al error (Wang, 2001).

El modelo molecular de TRL descrito para procariontes se sustenta en investigaciones sobre el operon *umuDC<sub>Ec</sub>*, donde la TLR ha sido reproducida *in vitro* inicialmente por H. Echols y col., y más recientemente por Livneh y Goodman, empleando para ello componentes purificados y en ausencia de la holoenzima DNA Pol III (Livneh, 2001). La DNA Pol V por si sola, posee una débil actividad polimerasa, incapaz de reparar sitios abásicos, además de presentar una baja procesividad. Sin embargo, es enormemente activada y adquiere la habilidad de reparar dichas lesiones bajo la adición de las proteínas UmuD', RecA, Ssb y seis

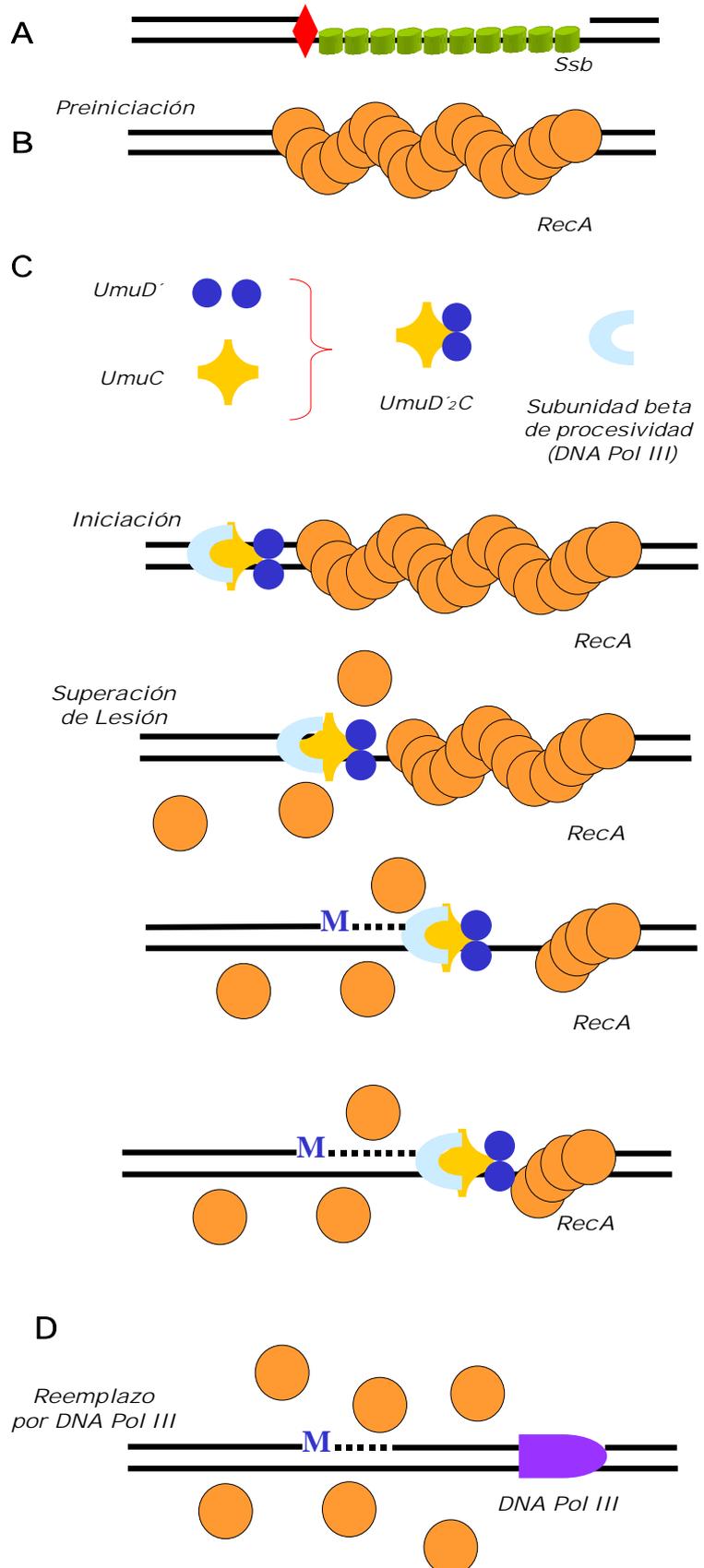
proteínas adicionales, las cuales son subunidades de la holoenzima DNA Pol III (la subunidad  $\beta$  de procesividad y cinco subunidades del complejo  $\gamma$ ).

De acuerdo a ello, Goodman y Livneh proponen el modelo representado en la Figura 9. En dicho modelo, la horquilla de replicación se detiene por la presencia de lesiones en el DNA. En este estado, el DNA es rodeado por la proteína Ssb, cuya mejor función es la de evitar la formación de estructuras secundarias y facilitar la replicación (Livneh, 2001). Un primer paso, llamado de “preiniciación”, RecA desplaza a la proteína Ssb, ensamblando el nucleofilamento en la dirección 5'→3' (que induce la respuesta SOS, ya descrito en la sección 6.1.1.) cubriendo la región de ssDNA y se prolonga hasta una región adyacente a dsDNA, mas allá de la lesión. El paso siguiente es la “iniciación”, donde la DNA Pol V se une al extremo terminal del nucleofilamento guiada por esta misma estructura, requiriendo para ello la disociación de ciertos monómeros de RecA. Esta sugerencia está basada en el hecho de que la inhibición de la iniciación TLR causada por ATP $\gamma$ S (el cual es un análogo del ATP con escasa capacidad de ser hidrolizado), estabiliza fuertemente la unión RecA al DNA. La fuerte unión probablemente inhibe los desplazamientos de RecA del nucleofilamento. La DNA Pol V es estabilizada por interacciones proteína-proteína e interacciones DNA-proteína, donde UmuD' interactúa con el filamento núcleoproteico y a la vez con UmuC, no existiendo una interacción directa entre UmuC y RecA (Livneh, 2001; Pham, *et al.* 2001a; Pham, *et al.* 2002). Ello se vería consolidado también, por la presencia de la subunidad  $\beta$  de procesividad y el complejo  $\gamma$  de la DNA Pol III. Una vez ensamblado el complejo, éste se desplaza hasta localizar la lesión, replicando sobre ella y la síntesis se continua unos seis u ocho nucleótidos más. Finalmente la DNA Pol V es reemplazada por la DNA Pol III, la cual continua la síntesis de DNA normal (Janión, 2001).

Se ha demostrado en estudios previos, que el desensamblaje de RecA, es una reacción que requiere la hidrólisis de ATP y que se efectuaría de modo bidireccional, desde el extremo terminal 3' por parte de la DNA Pol V y desde el extremo terminal 5', posiblemente de modo espontáneo (o estimulado por Ssb) (Livneh, 2001).

A la fecha, todas las DNA polimerasas que forman parte del regulón SOS, están involucradas en la inducción de mutagénesis, aún cuando esta dependerá de la naturaleza de la lesión inicial ocasionado por un mutágeno dado. Bajo este contexto, se señala que aductos generadas por N-2-acetilaminofluoreno pueden ser replicados por la DNA Pol II, conduciendo a deleciones (-2 pb), mientras que la actividad de la DNA Pol V estaría libre de error. Por otro lado, los aductos generados por benzo( $\alpha$ )pireno producen corrimientos del marco de lectura (-1 pb), pero se requiere para ello la actividad de la DNA Pol IV y la de la DNA Pol V. (Janion, 2001; Pham, *et al.* 2002). Asimismo, datos experimentales sostienen que frente a sitios abásicos se inserta generalmente una adenina, dos adeninas frente a dímeros timina-timina CPD y guanina-adenina frente a dímeros 6-4 timina-timina por parte de la DNA Pol V (Livneth, 2001; Pham, *et al.* 2001; Pham, *et al.* 2002).

**Figura 9.-** Modelo propuesto Goodman y Livneh de Síntesis de Translesión (TLR) por la DNA Pol V. A) Inicialmente las regiones de ssDNA, originadas por la presencia de lesiones, son recubierta por la proteína Ssb. B) Posteriormente sucede la fase de “preiniciación”, en la cual son removidas las proteínas Ssb por RecA, ensamblándose el nucleofilamento. C) En la fase de “iniciación” se estabiliza la DNA Pol V (UmuD<sub>2</sub>C, la subunidad β y complejo γ de Pol III al extremo del nucleofilamento, e inicia la síntesis a través de la lesión, originando posiblemente una mutación (M). D) Por último la DNA Pol V es reemplazado por la DNA Pol III restableciéndose la replicación normal del DNA.



### 6.2.- REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS

El proceso de reparación por escisión de nucleótidos (NER) presenta una alta fidelidad y es considerado un mecanismo de reparación libre de error. En él pueden distinguirse dos modalidades. La primera de ellas es la reparación de tramos cortos del DNA ("short-patch repair") y corresponde a un 99% de la actividad de este mecanismo de reparación. El 1% restante implica la reparación de tramos largos de DNA ("long-patch repair"), de unos 1500 nucleótidos de longitud, y es una función SOS ya que no tiene lugar en mutantes defectivos en esta respuesta. Ambos procesos requieren de la participación de genes SOS (*uvrA*, *uvrB*, *uvrD*), del gen *uvrC* (que no está regulado por *LexA*) y de las actividades de la DNA Pol I y de la DNA ligasa (Sedgwick, *et al.* 1991).

Este proceso NER se caracteriza porque la lesión es reconocida por un complejo enzimático denominado UvrABC, también conocido como escinucleasa UvrABC. Este presenta baja especificidad en el reconocimiento de daño, por la cual actúa sobre un amplio rango de sustratos (Nunoshiba, y Yamamoto, 1999). Adicionalmente, este proceso se complementa con los procesos de reparación por recombinación, removiendo enlaces cruzados en el DNA (Friedberg, *et al.* 1995).

El gen *uvrA* está localizado en el minuto 92 del mapa genético de *E. coli* y en el minuto 92,3 del mapa de *S. enterica* Typhimurium (Sanderson, *et al.* 1995), es monocistrónico y se halla separado por 253 pb del gen *ssb* (que codifica una proteína de unión al ssDNA). Tanto *uvrA* como *ssb* se transcriben divergentemente y ambos forman parte del regulón SOS. El gen *uvrA* codifica una proteína de 940 aminoácidos y 103,9 kDa de masa molecular. La expresión basal de *uvrA* da lugar a alrededor de 20-25 moléculas por célula de UvrA, aumentando esta concentración hasta en 10 veces al inducirse el sistema SOS (Friedberg, *et al.* 1995).

La secuencia de aminoácidos revela la presencia de dos secuencias consenso llamadas Walker tipo A y Walker tipo B en el reconocimiento de purinas, siendo la secuencia tipo A la más conservada. A la vez, se han identificado dos dominios de unión de ATP, así como dos regiones de unión a Zn y otra región que puede configurar un motivo tipo "hélice-giro-hélice". Asimismo, es importante

señalar la existencia en su extremo C-terminal de una región rica en glicinas que estaría implicada en el reconocimiento del daño en el DNA. Se ha sugerido que la unión de la proteína UvrA al ATP (no la hidrólisis) origina un cambio conformacional que favorece la dimerización, dado que UvrA se halla como monómero en ausencia de ATP, pero dimeriza en su presencia. También se ha descrito que la región localizada en el extremo N-terminal (+/- 230 aminoácidos) se requiere para interactuar con la proteína UvrB y que prácticamente todo el polipéptido (940 aminoácidos) es necesario para la unión al DNA.

Análisis más detallados, así como la comparación de su secuencia con otras ATPasas de procariontes, revelan la existencia de regiones de homología (aproximadamente del orden de los 250 aminoácidos), lo que sugiere que la proteína UvrA es miembro de una superfamilia de ATPasas de procariontes. Esta superfamilia, incluye proteínas involucradas en el transporte activo, resistencia a multidrogonas, modulación de la división celular, fijación de nitrógeno, proteínas de exportación, recombinación y replicación, así como proteínas de membrana citoplasmática (Friedberg, *et al.* 1995).

El gen *uvrB* también es monocistrónico y se halla ubicado en el minuto 18,4 del mapa cromosómico de *S. enterica* Typhimurium (Sanderson, *et al.* 1995) y al igual que *uvrA*, forma parte del regulón SOS, aumentando hasta en 10 veces su expresión al inducirse dicho sistema (Sancar, *et al.* 1980; Tao, 1999). Experiencias *in vitro* en *E. coli*, demuestran que *uvrB* presenta dos promotores solapados, denominados P1 y P2, y que el represor LexA actuaría en el operador P2, dado que la transcripción desde P2 se inhibe en la presencia de LexA, mientras que no tiene ningún efecto sobre P1 (Friedberg, *et al.* 1995). Un tercer promotor ha sido identificado, designado como P3 a 320 pb "upstream" de P2 (Friedberg, *et al.* 1985).

La secuencia de la proteína UvrB está relacionada con la superfamilia de helicasa I y II, mostrando seis motivos helicasas que están distribuidos sobre los primeros 544 residuos de los 673 que constituyen la proteína de *E. coli*. La proteína no posee actividad helicasa, pero el complejo UvrA<sub>2</sub>B exhibe actividad helicasa. Los residuos C-terminales de UvrB muestran regiones de homología con UvrC.

Además, los residuos 115-250 de UvrB muestran homología con la proteína Mfd (Theis, *et al.* 2000).

La tercera proteína del complejo UvrABC es la proteína UvrC, la cual es la responsable de efectuar dos incisiones (incisión dual) alrededor del sitio de la lesión. Esta proteína se une a UvrB formando el complejo denominado de “preincisión”, desplazando a UvrA. Las dos incisiones se suceden en un orden establecido: la primera de ellas en el extremo 3´ de la lesión y la segunda en el 5´. Esta proteína presenta dos dominios. El dominio N-terminal se caracteriza por catalizar la primera incisión en el lado 3´ de la lesión y presenta gran homología con el dominio catalítico de la familia de endonucleasas GIY-YIC. En este mismo dominio también existe otra región que interactúa con la proteína UvrB durante el establecimiento del complejo de incisión UvrBC-DNA. El segundo dominio, el C-terminal, es responsable de la incisión en el lado 5´ de la lesión (Theis, *et al.* 2000; Van Houten *et al.* 2002).

La secuencia genómica de *E. coli* ha permitido revelar la presencia de un gen, designado como *ydjQ*, que codifica una proteína de 295 aminoácidos de una masa molecular de 33 Kda, que en la actualidad es denominada “Cho”. Esta proteína es homóloga a UvrC, forma parte del regulón SOS (a diferencia de UvrC) y es capaz de efectuar la incisión 3´ en presencia de UvrA y UvrB, siendo esta incisión muchas veces más eficiente que la efectuada por UvrC en determinados tipos de lesión (Moolenaar, *et al.* 2002; Van Houten *et al.* 2002).

En cuanto al modo en que opera el proceso NER, se postula que inicialmente se forma un complejo integrado por dos monómeros UvrA y un monómero UvrB (UvrA<sub>2</sub>B), aunque en la actualidad se está proponiendo un nuevo modelo en el cual participarían dos subunidades UvrB (UvrA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) (Verhoeven, *et al.* 2002). Dicho complejo se desplaza a lo largo de la molécula de DNA y se detiene ante la existencia de alguna distorsión, producto de alguna lesión en el DNA. La actividad helicasa del complejo UvrAB separa la doble hebra del DNA, permitiendo un contacto más íntimo entre la proteína y la lesión, dando lugar a lo que se denomina “complejo de pre-incisión”. Seguidamente, los monómeros UvrA son liberados y reemplazados por UvrC, estableciéndose el llamado “complejo de

incisión" (UvrBC), el cual introduce un corte 3' a una distancia media de 4 o 5 nucleótidos de la lesión. A continuación, UvrC introduce otro corte en el enlace fosfodiéster 5' a 7-8 nucleótidos de la lesión y se escinde un oligonucleótido de 12 a 13 bases que contiene la lesión, gracias a la actividad UvrD. Como consecuencia de todo este proceso, se origina en el DNA una discontinuidad transitoria que es restituida por la enzima DNA Pol I, empleando como molde la hebra complementaria. Finalmente, la resíntesis es sellada por la DNA ligasa (Fridovich, 1998; Theis, *et al.* 1999; Theis, *et al.* 2000).

### 6.3.- LESIONES OXIDATIVAS Y REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES

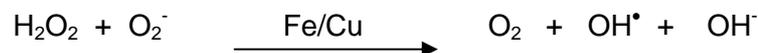
Las lesiones oxidativas se producen como consecuencia del metabolismo celular y también por la exposición de las células a diferentes agentes físicos y químicos. Este tipo de lesiones se generan como consecuencia de la reactividad de las denominadas especies reactivas del oxígeno (EROs) con el DNA. Éstos están representadas por un conjunto tanto de radicales libres (tales como átomos, iones, o moléculas con uno o más electrones no apareados en el orbital más externo), como de moléculas derivadas del oxígeno que tienen alta capacidad reactiva (Farr, *et al.* 1991; Gil del Valle, *et al.* 1999). Seguidamente se comentan en detalle los principales EROs, clasificados en EROs radicales y EROs no radicales (Farr, *et al.* 1991; Kawanishi, *et al.* 2001).

#### □ EROs Radicales.

Uno de los radicales más importantes es el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el cual es un monoradical cargado negativamente y ampliamente producido *in vivo*, fruto de la reducción monovalente del oxígeno molecular en diferentes procesos (Farr, *et al.* 1991). El  $O_2^-$  posee un tiempo de vida medio del orden de milisegundos y es transformado por la superóxido dismutasa (SOD) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) con una constante de reacción rápida, aunque también puede ocurrir sin la intervención de la enzima. El  $O_2^-$  presenta una reactividad débil; sin embargo, puede penetrar membranas biológicas y causar daño a blancos específicos (Gil del Valle, *et al.* 1999; Hansberg, 2002).

El  $O_2^-$  es capaz de reaccionar con el ácido ascórbico al que transforma en radical semidehidroascorbato, el cual es poco reactivo y no causa daño biológico significativo. Asimismo, puede reaccionar con grupos tioles, aunque la velocidad de esta reacción es baja ( $< 10^3 M^{-1}s^{-1}$ ). Adicionalmente, la reacción del  $O_2^-$  con el glutatión (GSH) produce radicales sulfurados más lesivos a la célula que el propio  $O_2^-$  (Gil del Valle, *et al.* 1999; Kawanishi, *et al.* 2001).

Cuando existe una sobreproducción de  $O_2^-$  y una merma de sus secuestradores, se genera una cascada de eventos oxidativos, que tienen como componente crítico a la reacción de Haber-Weiss (Farr, *et al.* 1991).



Paralelamente, pueden movilizar el hierro de las reservas intracelulares de ferritina y reaccionar con el hierro férrico para dar lugar al radical perferrilo (Gil del Valle, *et al.* 1999).

El radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) es considerado como el más reactivo en los sistemas biológicos, ya que tiene la capacidad de reaccionar con casi todas las moléculas biológicas con una constante de velocidad del orden de  $10^9-10^{10} M^{-1}s^{-1}$ . Se genera esencialmente a partir del  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  a través de la reacción de Haber-Weiss señalada anteriormente y la de Fenton, las cuales requieren trazas de metales de transición como catalizadores, siendo el Fe el más importante *in vivo* (Keyer, *et al.* 1995; Gil del Valle, *et al.* 1999; Termini, 2000; Kawanishi, *et al.* 2001).

Reacción de Fenton:



En este caso no existen secuestradores específicos *in vivo* para este radical.

La interacción del  $OH^\bullet$  con los ácidos grasos poliinsaturados que componen los fosfolípidos de las membranas da lugar al daño oxidativo celular. El  $OH^\bullet$  puede atacar un átomo de hidrógeno metilénico de un ácido graso y formar un radical

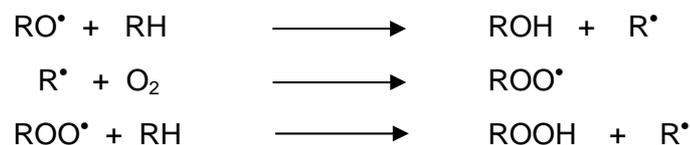
lipídico  $R^{\bullet}$ , dejando un electrón desapareado en el átomo de carbono metilénico, el cual sufre un reordenamiento molecular que produce un dieno conjugado que reacciona con el  $O_2$  y da lugar a un radical hidroxiperoxil lipídico ( $ROO^{\bullet}$ ). Dicho radical extrae un átomo de hidrógeno del carbono del grupo metilénico del ácido graso poliinsaturado adyacente y formar otro radical  $R^{\bullet}$  y el hidroperoxilo lipídico  $ROOH$  (Gil del Valle, *et al.* 1999; Hansberg, 2002). El radical  $R^{\bullet}$  puede combinarse con otra molécula de oxígeno y dar lugar a una reacción en cadena denominada peroxidación lipídica o bien puede unirse a otro radical lipídico para formar un complejo no reactivo a expensas de la unión cruzada de los ácidos grasos de membrana, disminuyendo su fluidez (Hansberg, 2002).

El  $ROOH$  es un complejo estable si no interacciona con iones metálicos de transición, pero si lo hace, se inicia la generación de radicales con su consecuente propagación (Gil del Valle, *et al.* 1999).

Iniciación :



Propagación :



### □ EROs No Radicales.

En este grupo se incluye al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual se forma *in vivo* por transformación espontánea del  $O_2$  o bien enzimáticamente (SOD, glucosa oxidasa, diaminoácido oxidasa y otras oxidasas). A bajas concentraciones, el  $H_2O_2$  es poco reactivo, sin embargo a altas concentraciones interactúa con los sistemas generadores de energía y los inactiva. Por otro lado, el  $H_2O_2$  es capaz de oxidar los grupos tioles de las proteínas. El efecto más nocivo del  $H_2O_2$  es la formación de  $OH^{\bullet}$  catalizado por metales de transición. El  $H_2O_2$  se elimina por la acción de la catalasa y de la peroxidasa, aunque algunos cetoácidos como el piruvato pueden

reaccionar lentamente y ser capaces de ofrecer cierta protección *in vivo* (Gil del Valle, *et al.* 1999).

El segundo compuesto de este grupo y no menos importante es el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) que se forma cuando uno de los dos electrones libres capta energía y cambia de spin. Cuando esto sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre, por eso hay dos especies de oxígeno singlete, el  $\Sigma\text{g}^+$  que tiene los dos electrones desapareados pero con spin opuesto, y el  $^1\Delta\text{g}$  en el que estos electrones se han apareado. Probablemente, el primero de ellos sea el más relevante en los sistemas biológicos, por tener un tiempo de vida mayor. (Farr *et al.*, 1991; Gil del Valle, *et al.* 1999) El  $^1\text{O}_2$  es un potente oxidante capaz de reaccionar con múltiples moléculas con las que no reacciona el oxígeno en su estado basal (Fridovich; 1998; Kawanishi, *et al.* 2001; Hansberg, 2002).

### 6.3.1.- REGULACION DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES

El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio entre EROs y antioxidantes, a favor del primero, produciéndose daño celular y genotoxicidad (Herrera, *et al.* 1999; Pomposiello, *et al.* 2001). La respuesta celular frente al daño oxidativo incluye la activación de diferentes procesos que están finamente regulados en tiempo y espacio y que deben ser activados en proporciones diferentes y adecuadas. Así por ejemplo, si la síntesis de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se induce a elevado nivel, podría obtenerse peróxido de hidrógeno intracelular, lo cual origina un estrés por este oxidante. Por tanto, es deseable que la expresión de la SOD esté acompañada por la inducción de un gen que codifique una enzima que remueva el peróxido de hidrógeno, como sería la catalasa o la peroxidasa. (Farr, *et al.* 1991; Gil del Valle, *et al.* 1999).

La primera línea de defensa está representada por agentes quelantes de metales (Gil del Valle, *et al.* 1999), lo cual impide que estos puedan catalizar las reacciones que dan lugar a la formación de EROs (Farr, *et al.* 1991). Una segunda barrera está representada por compuestos de bajo peso molecular y enzimas antioxidantes (Gil del Valle, *et al.* 1999), con el objetivo de detoxificar principalmente de  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de desactivar otras EROs, antes de que puedan actuar y dañar a

las biomoléculas. En esta categoría se encuentran el glutatión reducido (GSH), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (Abril, *et al.* 1999.; Pomposiello, *et al.* 2001).

*E. coli* posee dos hidroperoxidasas, denominadas HPI y HPII, cuya actividad es la detoxificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La HPI presenta actividad catalasa y peroxidasa y está codificada en el gen *katG*, cuya transcripción es inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y dependiente del regulón *oxyR*. En cambio, HPII presenta sólo actividad catalasa y está codificada en el gen *katE*, el cual incrementa su expresión en la fase estacionaria de crecimiento y es dependiente del regulón *rpoS* (Abril *et al.* 1999).

Paralelamente, *E. coli* posee tres enzimas con actividad superóxido dismutasa que la protegen de los radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La Fe-SOD presenta una síntesis constitutiva y está codificada en el gen *sodB*, mientras que la Mn-SOD codificada en el gen *sodA*, forma parte del regulón *soxRS*. Finalmente, se ha reportado la presencia de una tercera SOD, denominado Cu/Zn-SOD, que es producto del gen *sodC*. (Abril, *et al.* 1999; Pomposiello, *et al.* 2001). Si bien este último parece tener poco efecto, dado que dobles mutantes *sodA*<sup>-</sup> y *sodB*<sup>-</sup> sólo exhiben niveles residuales de SOD, por debajo del 1% del total de actividad de las cepas silvestres (Farr, *et al.* 1991; Abril, *et al.* 1999; Pomposiello, *et al.* 2001).

Una última línea de defensa, comprende actividades enzimáticas, dirigidas a procesos de reparación, que corrigen las lesiones producidas en las biomoléculas por las EROs que escaparon a los mecanismos comentados anteriormente. La mayoría de ellas están dedicados a la reparación del DNA y en menor grado a procesos de reparación de proteínas y lípidos. (Abril, *et al.* 1999; Pomposiello, *et al.* 2001).

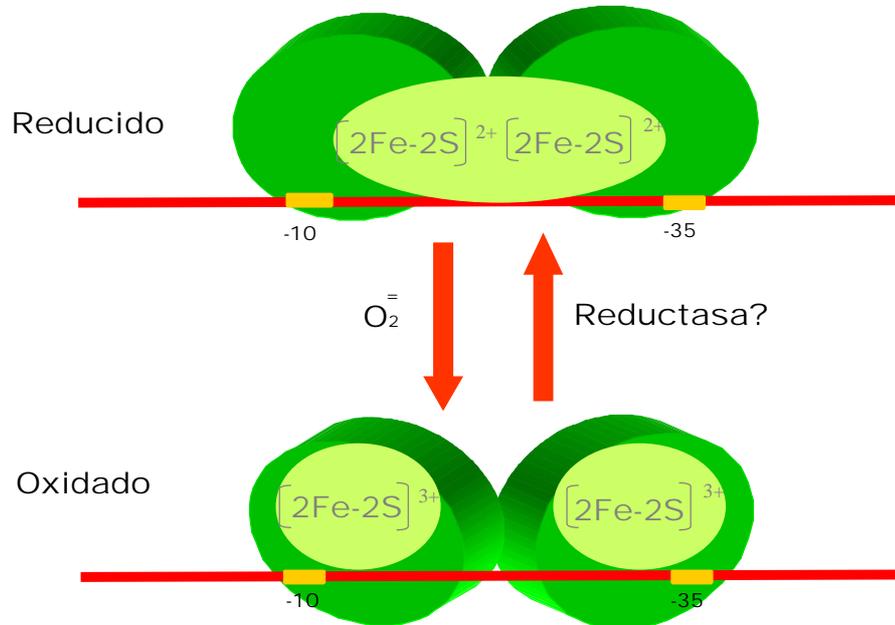
En años recientes, la regulación redox se ha definido como la modulación de la actividad proteica por oxidación y reducción, la cual es reconocida como un importante mecanismo de control de actividades celulares, donde los sensores redox son factores de transcripción que detectan niveles de agentes oxidantes, tales como peróxido de hidrógeno, superóxidos, óxido nítrico y otros.

El regulón *soxRS* está controlado por los activadores transcripcionales SoxR y SoxS, codificados en los genes *soxR* y *soxS*, que actúan en cascada y modulan la expresión de más de 16 genes (Pomposiello, *et al.* 2001; Spek, *et al.* 2001). En este regulón, dos etapas son las que median la respuesta celular al estrés oxidativo (Farr, *et al.* 1991; Altuvia, 1997).

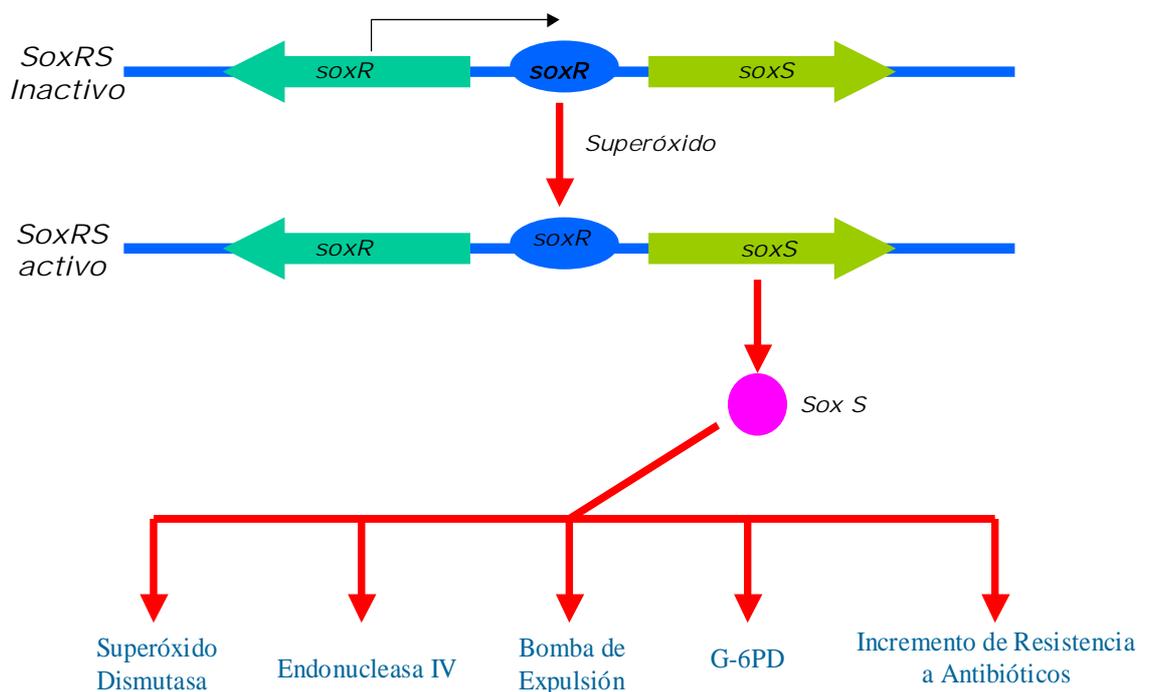
La proteína SoxR, activador transcripcional de SoxS, es una proteína de 17 kDa que contiene Fe y S, cuya síntesis basal da lugar a una concentración de 100 moléculas por célula aproximadamente (Zheng, *et al.* 2000; Pomposiello, *et al.* 2001). En su extremo amino terminal, SoxR presenta el motivo hélice-giro-hélice de la familia de activadores transcripcionales MerR, que le permite unirse al DNA (Zheng *et al.* 2000). En solución forma dímeros y cada monómero contiene un grupo  $[2\text{Fe} - 2\text{S}]$ , por lo que el dímero presenta 4 residuos de Cys en la secuencia  $\text{CysX}_2\text{CysXCysX}_2\text{Cys}$ , siendo X cualquier aminoácido. Estos grupos (2Fe - 2S) son esenciales para la activación transcripcional de SoxR, tanto *in vivo* como *in vitro* (Zheng, *et al.* 2000). Los átomos de Fe que contienen SoxR, pueden ser oxidados  $[\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}]$  por el anión superóxido (Figura 10), convirtiéndolo en un potente activador transcripcional de SoxS, ya que en esta forma oxidada es capaz de aumentar su transcripción hasta cien veces (Pomposiello, *et al.* 2001). SoxR puede volver a su estado inicial de reducción, probablemente gracias a las flavodoxinas (genes *fldA* y *fldB*) y a la ferredoxina-NADPH oxido reductasa (gen *fpr*). Ambos procesos de oxidación y reducción de SoxR pueden ocurrir en tiempo bastante breves (minutos) (Zheng, *et al.* 2000).

La proteína SoxS activa la transcripción de los genes del regulón (Figura 11), los cuales aparecen descritos en la Tabla 3 y que en conjunto están involucrados en la detoxificación de las EROs y la reparación del DNA (Cabisco, 2000; Zheng, *et al.* 2000; Farr, *et al.* 1991; Pomposiello, *et al.* 2001). Adicionalmente, esta activación de genes no sólo contribuye a la protección contra el daño oxidativo, sino que también confiere resistencia a antibióticos, solventes orgánicos y metales pesados (Zheng *et al.* 2000; Pomposiello, *et al.* 2001).

**Figura 10.-** Mecanismo de activación de SoxR. El dímero SoxR se une al DNA bajo la forma reducida (inactivo). Posterior a la activación por superóxido, el Fe del complejo Fe-S es oxidado, originando un cambio conformacional local que modifica la topología local del DNA y permitiendo un incremento de la transcripción de *soxR*.



**Figura 11.-** El locus *soxRS* está compuesto por la transcripción divergente de los genes *soxR* y *soxS*. La proteína SoxR se sintetiza de modo constitutivo pero es activada por el anión superóxido. La forma oxidada de SoxR potencia la transcripción de *soxS*, el cual es también un activador transcripcional. La proteína SoxS activa la transcripción de genes que incrementan la resistencia a agentes oxidativos.



**Tabla 3.-** Genes del regulón *soxRS*.

Gen	Función	Referencia
<i>soxS</i>	Activador transcripcional de genes blanco de regulón <i>soxRS</i>	Pomposiello <i>et al</i> , 2001
<i>sodA</i>	Superóxido dismutasa-Mn	Zheng, 2000 Pomposiello <i>et al</i> , 2001
<i>zwf</i>	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	Zheng <i>et al</i> . 1999 Pomposiello <i>et al</i> , 2001
<i>fldA</i>	Flavodoxina	Zheng, 2000 Pomposiello <i>et al</i> , 2001
<i>fldB</i>	Flavodoxina	Pomposiello <i>et al</i> , 2001
<i>fpr</i>	NADPH-ferrodoxina reductasa	Zheng <i>et al</i> . 1999 Zheng, 2000 Pomposiello <i>et al</i> , 2001
<i>fur</i>	Regulador en metabolismo del hierro	Pomposiello <i>et al</i> , 2001
<i>nfo</i>	Endonucleasa IV (Proceso de reparación del DNA)	Zheng <i>et al</i> . 1999 Zheng, 2000 Pomposiello <i>et al</i> , 2001
<i>micF</i>	RNA regulador en la expresión de la porina OmpF	Zheng, 2000 Pomposiello <i>et al</i> , 2001
<i>fumC</i>	Fumarasa C	Zheng, 2000
<i>acnA</i>	Aconitasa A	Zheng, 2000
<i>acrAB</i>	En sistema de bomba de flujo	Pomposiello <i>et al</i> , 2001

Junto al regulón *soxRS*, numerosos trabajos han mostrado que la respuesta al daño oxidativo en *E. coli* y *S. enterica* Typhimurium también involucra a la proteína OxyR (Storz, 1987; Kullik, 1995; Zheng *et al*. 1998). Dicha proteína es un factor de transcripción que controla la expresión de los genes que integran el regulón *oxyR* (Tabla 4), en respuesta a elevados niveles de agentes oxidativos como el peróxido de hidrógeno (Tao, 1997; Tao, 1999; Zheng *et al*. 2000).

La proteína OxyR es un miembro de la familia de reguladores transcripcionales LysR (Kullik, 1995; Pomposiello, *et al*. 2001). Esta familia está integrada por proteínas de unión al DNA que regulan positivamente la expresión de sus genes blanco, aunque frecuentemente también regulan negativamente su propia expresión y la de otros. OxyR presenta una masa molecular de 34 kDa y en solución forman tetrámeros (Zheng, *et al*. 2000) En su dominio amino terminal presenta el motivo HTH (entre los residuos 6–66) y es responsable de su unión al DNA, mientras que el extremo carboxi terminal parece también contribuir a dicha unión (Zheng, *et al*. 2000; Pomposiello, *et al*. 2001).

Como muchos otros factores de transcripción, además del dominio de unión a DNA, OxyR posee dominios que le permiten detectar al agente oxidativo, reconociendo así las señales celulares que conducen a la activación de la expresión génica. Es interesante señalar que en este mecanismo únicamente una proteína es la responsable de activar la respuesta celular. Esta característica debe ser importante para aquellos microorganismos de crecimiento rápido, ya que necesitan adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones ambientales.

Desde los estudios iniciales, se demostró que la proteína OxyR de *E. coli* se presenta en dos conformaciones, bajo la forma oxidada y la reducida. La oxidación de OxyR por peróxido de hidrógeno conduce a la formación de enlaces disulfuro en OxyR y son responsables de su activación como factor transcripcional (Figura 12), ya que únicamente la forma oxidada de OxyR es capaz de unirse a los promotores de los genes del regulón. La forma oxidada de OxyR reconoce cuatro repeticiones de la diana ATAG, que se encuentra en los promotores de los genes del regulón, activando así su transcripción. Asimismo, por estudios de desnaturalización y renaturalización de OxyR, en presencia de quelante de metales, se ha observado que determinados iones metálicos y otros grupos prostéticos deben participar en la activación de OxyR (Zheng, *et al.* 2000).

**Tabla 4.-** Genes del regulón *oxyR*.

<b>Gen</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
<i>dps</i> *	Proteína de unión al DNA	Zheng <i>et al.</i> 1999 Zheng, 2000 Pomposiello <i>et al.</i> , 2001 Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>katG</i> *	Catalasa Hidroperoxidasa I	Zheng <i>et al.</i> 1999 Minchan <i>et al.</i> 1999 Tao, 1999 Zheng, 2000 Pomposiello <i>et al.</i> , 2001 Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>grxA</i>	Glutarredoxina I	Zheng <i>et al.</i> 1999 Tao, 1999 Zheng, 2000 Pomposiello <i>et al.</i> , 2001 Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>ahpF</i>	Subunidad mayor de Alquil hidroperóxido reductasa	Zheng <i>et al.</i> 1999 Minchan <i>et al.</i> 1999 Tao, 1999 Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>trxC</i>	Tiorredoxina 2	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>ahpC</i>	Subunidad menor de Alquil hidroperóxido reductasa	Minchan <i>et al.</i> 1999
<i>fur</i>	Regulador en el metabolismo del hierro	Zheng, 2000 Pomposiello <i>et al.</i> , 2001
<i>gorA</i> *	Glutation reductasa	Zheng <i>et al.</i> 1999 Minchan <i>et al.</i> 1999 Tao, 1999 Zheng, 2000 Pomposiello <i>et al.</i> , 2001
<i>dsbG</i>	Chaperona disulfuro isomerasa	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>flu</i> **	Antígeno 43 de membrana externa	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>fhuF</i> **	Reductasa férrica	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>hemH</i>	Ferroquelatasa	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>sufA</i>	Mobilización de sulfuro	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>sufB</i>	Mobilización de sulfuro	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>sufC</i>	Mobilización del sulfuro	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>sufD</i>	Mobilización de sulfuro	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>sufS</i>	Mobilización de sulfuro	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>sulE</i>	Mobilización de sulfuro	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>yaaA</i>	Función desconocida	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>yaiA</i>	Función desconocida	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>ybjM</i>	Función desconocida	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>yjA</i>	Función desconocida	Zheng <i>et al.</i> 2001
<i>oxyS</i>	Pequeño RNA regulador post-transcripcional (regulando aproximadamente 40 genes)	Zheng <i>et al.</i> 1999 Zheng, 2000

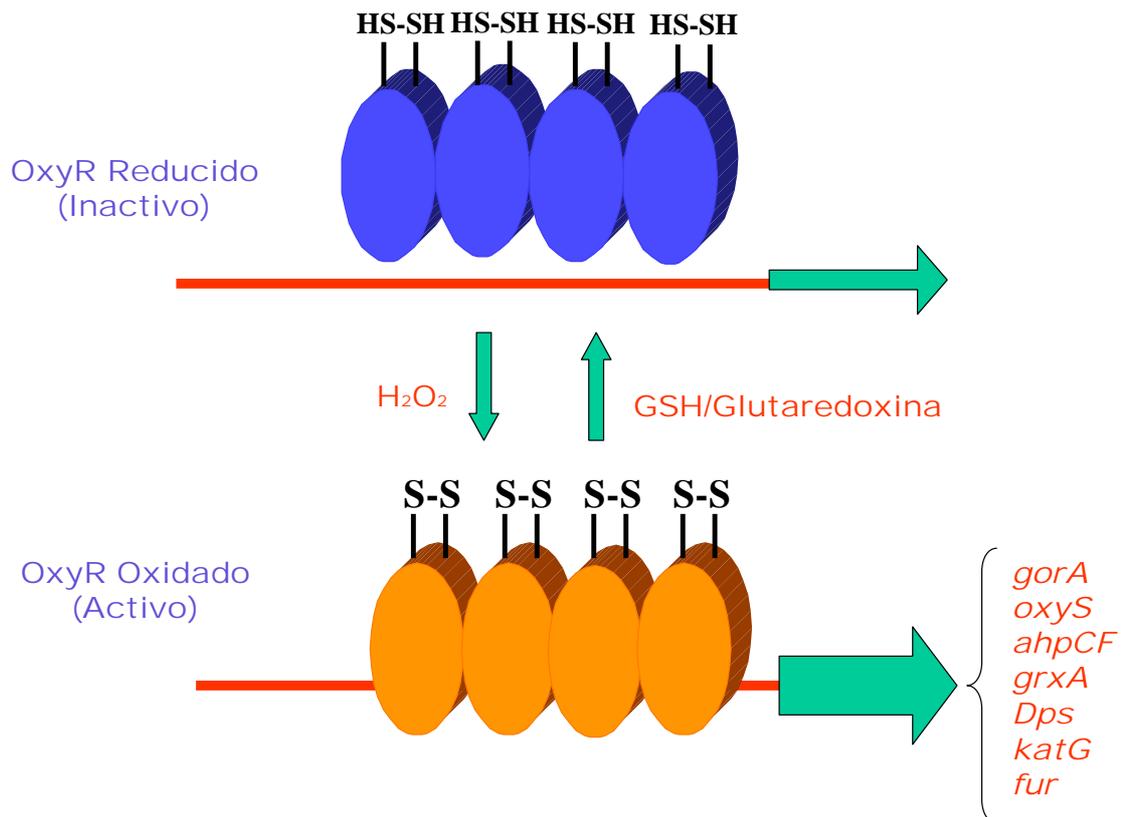
\* Genes regulados a la vez por regulón *rpoS* ( $\sigma^S$ ).

\*\* Genes reprimidos por OxyR, aunque se especula que otros genes, como *uxuA*, *ytfK*, *ycdH*, *ycdN* y *yaeH*, también puedan estar bajo represión.

Los estudios realizados con mutantes de OxyR han permitido determinar que los mutantes constitutivos *oxyR2*, que sobreexpresan los genes regulados por OxyR, son más resistentes al peróxido de hidrógeno que las cepas silvestres. Por el contrario, mutantes de delección *oxyR* son hipersensibles al peróxido de hidrógeno, ya que no sobreexpresan los genes del regulón (Zheng, *et al.* 1998; Cabiscol, *et al.* 2000; Zheng, *et al.* 2000). A través de la obtención de mutantes, se sugirió que uno, o posiblemente dos, de los seis residuos de cisteína que contiene OxyR son críticos en la activación de OxyR a través de la formación de enlaces disulfuro. Así, se demostró que mutantes en  $\text{Cys}^{199} \rightarrow \text{Ser}^{199}$  no se expresa el gen *oxyS* del regulón y que en mutantes  $\text{Cys}^{208} \rightarrow \text{Ser}^{208}$  su expresión se ve disminuida. Estos datos apuntan que los residuos  $\text{Cys}^{199}$  y  $\text{Cys}^{208}$  son importantes para la activación de OxyR (Zheng, *et al.* 2000), aún cuando se ha postulado que el papel del residuo  $\text{Cys}^{199}$  debe ser más crítico, sugiriéndose que habría una oxidación inicial de este residuo a través de la formación de un intermediario, el ácido sulfénico (-SOH), como un primer paso en la activación de OxyR (Zheng *et al.* 1998; Tao, 1999; Zheng *et al.* 2000).

OxyR se oxida completamente por el peróxido de hidrógeno en aproximadamente 30 segundos en cepas silvestres en crecimiento logarítmico y se mantiene oxidado durante unos cinco minutos (Zheng, *et al.* 1998). Esta cinética es bastante similar a la obtenida *in vitro*, donde la oxidación completa de OxyR se obtiene a los 30 segundos y se mantiene durante de 10 a 30 minutos (Tao, 1999). La reducción de OxyR en *E. coli* se debe a la acción del glutatión junto con la glutarredoxina y de la tiorredoxina reductasa con la tiorredoxina (Cabiscol, *et al.* 2000; Zheng, *et al.* 2000).

**Figura 12.-** El Regulón *oxyR*. La proteína OxyR es sintetizada constitutivamente y puede ser oxidada por el peróxido de hidrógeno. Cada subunidad del tetrámero OxyR contiene dos residuos de cisteína que de forma intramolecular establecen enlaces disulfuro por exposición al peróxido de hidrógeno. Estos enlaces pueden revertir nuevamente por el sistema GSH-glutarredoxina.



### 6.3.2.- REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES

Este mecanismo de reparación se caracteriza por la participación inicial de una DNA glicosilasa que presenta especificidad de reconocimiento de un tipo dado de lesión. Por tanto, cada DNA glicosilasa repara generalmente un único tipo de daño (Cadet, *et al.* 2000). Estas DNA glicosilasas catalizan la hidrólisis del enlace N-glicosídico de una base químicamente modificada o inapropiada, dando lugar a un sitio apurinico (APu) o apirimidínico (APy) (Farr y Kogoma, 1991; Cadet, *et al.* 2000). En la Tabla 5 se muestran estas enzimas, junto con el substrato que

reconocen, y los productos que generan. Con posterioridad a la acción de las DNA glicosilasas, interviene una segunda clase de enzimas, llamadas AP endonucleasas, que reconocen los sitios APu y Apy, ocasionando cortes al hidrolizar uno o ambos enlaces fosfodiéster inmediatos al sitio abásico. El evento post incisión es la incorporación de un nuevo nucleótido por medio de una resíntesis de DNA, teniendo como molde la cadena opuesta a la discontinuidad y participando en ello la DNA Pol I y la DNA ligasa (Sedgwick, *et al.* 1991; Kawanishi, *et al.* 2001).

Uno de los principales daños de tipo oxidativo es la generación de lesiones 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG) que pueden llegar a representar hasta el 30-50% del total de modificaciones inducidas, contribuyendo a la producción de transversiones G:C→T:A y A:T→CG (Urios, *et al.* 1996a; Ruiz-Laguna, *et al.* 1999; Kawanishi, *et al.* 2001). En la reparación de esta lesión participan dos DNA glicosilasas, MutM y MutY.

**Tabla 5.-** DNA glicosilasas y sustratos de reconocimiento durante la reparación por escisión de bases (BER).

ENZIMA	SUBSTRATO	PRODUCTOS
Uracil DNA glicosilasa	Uracilo	Uracil + Sitio AP
5-metil citosina DNA glicosilasa	5-metil citosina	5-metil citosina + sitio AP
Timina (mal apareadas) DNA glicosilasa	G-T	Timina + sitio AP
MutY DNA glicosilasa	G-A	Adenina + sitio AP
Dímeros de Pirimidina DNA glicosilasa	Dímeros de Py-Py	Dímero de Py-Py + sitio AP
Formamidopirimidina DNA glicosilasa	2,6-diamino-4-hidroxi-5-N-metilformamidopirimidina, también 8-oxoguaninas	2,6-diamino-4-hidroxi-5-N-metilformamidopirimidina o 8-oxoguaninas + sitio AP
Hmu DNA Glicosilasa	Hidroximetiluracilo	Hidroximetiluracilo + sitios AP
Hx DNA Glicosilasa	Hipoxantina	Hipoxantina + sitios AP
3-mA DNA Glicosilasa I	3-metiladenina	3-metiladenina + sitios AP
3.mA DNA Glicosilasa II	3-metiladenina, 7-metilguanina o 3-metilguanina	3-metiladenina, 7-metilguanina o 3-metilguanina + sitios AP
PD DNA Glicosilasa	Dímeros de pirimidina	Dímeros de pirimidina en DNA con uniones 5' glicosil + sitios AP

(tomado y modificado de Friedberg, 1995)

La proteína MutY presenta una masa de 36 kDa y está codificada en el gen *mutY* (o *micA*). Experimentalmente se ha comprobado que MutY purificada, permite la remoción de adeninas presentes en apareamientos erróneos A:G, A:8-oxoG o A:C y tiene asociada una actividad 3'AP liasa. La actividad DNA glicosilasa de MutY es cerca de 20 veces inferior en reparar el apareamiento erróneo C:A que el apareamiento A:G. Asimismo, mutantes *mutY* confieren a las células una gran hipermutabilidad, siendo el suceso mutacional mayoritario la transversión G:C→T:A (Friedberg, *et.al.* 1995; Kawanishi, *et al.* 2001; Fowler, *et al.* 2003). La proteína MutM (también denominada formamidopirimidina DNA glicosilasa) actúa sobre purinas modificadas, iniciando la reparación de 8-oxoG cuando está apareada con citosinas, dando lugar al apareamiento correcto G:C.

El suceso que tendría lugar, se inicia con la oxidación de guaninas en apareamientos G:C, produciendo la lesión 8-oxoG la cual debe ser reparada por MutM, restaurando la secuencia original G:C; si ello no sucede, y la célula empieza su replicación ocurren apareamientos erróneos 8-oxoG:C o 8-oxoG:A. Es entonces, donde MutY puede remover adeninas de los apareamientos 8-oxoG:A, dando como resultado el par de bases 8-oxoG:C, posibilitando nuevamente la participación de MutM. Ante la posibilidad de no ocurrir lo anterior y empieza una segunda replicación, sucederán entonces transversiones G:C→T:A (Fowler, 2003). Lo señalado se sustenta en evidencias de tipo genética, donde la sobreexpresión de MutM corrige completamente el fenotipo de mutantes *mutY*; mientras que dobles mutantes *mutY* y *mutM* incrementan enormemente la frecuencia de transversiones G:C→TA, frente a la suma de frecuencias de los mutantes simples, lo que condujo a proponer que ambas enzimas participan en una vía bioquímica común (Urios y Blanco, 1996b; Fowler, 2003).

### 7.- MUTAGÉNESIS Y QUINOLONAS

Las primeras sugerencias de que las quinolonas podían dar lugar a sucesos mutacionales en bacterias están referidas a los ácidos nalidíco y oxolínico (Levin, *et al.* 1994). Posteriormente, se confirmaron estos datos y se demostró claramente que otros compuestos de esta familia, también eran inductores de mutaciones en bacterias (Ysern, *et al.* 1990; Gocke, 1991; Mamber, *et al.* 1993).

Las mejores evidencias de esta actividad se han conseguido a través del ensayo de retromutación de *S. enterica* Serov. Typhimurium, que se caracteriza por disponer de una amplia colección de cepas de esta especie, las cuales poseen diferentes dianas mutacionales en el operon histidina y se basa en cuantificar la retromutación His<sup>-</sup> a His<sup>+</sup> (Maron y Ames, 1983). Algunas de estas cepas presentan una mayor sensibilidad a la acción de diferentes mutágenos, gracias a que su gen *uvrB* está deletado, poseen una mayor permeabilidad y contienen el plásmido pKM101, el cual promueve la síntesis de translesión dependiente del sistema SOS, gracias a la presencia del operon *mucAB* en dicho plásmido (Maron y Ames, 1983; Ames y Levin, 1986; Porwollik, *et al.* 2001).

Entre las diferentes cepas de *S. enterica* Serov. Typhimurium que integran este ensayo, es la cepa TA102 la que detecta la mutagénesis producida por quinolonas (Levin *et al.* 1982; Levin *et al.* 1984; Ysern, *et al.* 1990). Esta cepa se caracteriza por contener la diana mutacional (*hsG428*) en un plásmido multicopia, el pAQ1, el cual se presenta en unas 30 copias por célula. La mutación *hisG428* fue obtenida por tratamiento con 2-aminopurina y se caracteriza por ser una mutación sin sentido que afecta al codón 207 que codifica la fosforribosil ATP transferasa, enzima que cataliza la primera reacción de la ruta de biosíntesis de histidina. Una característica destacable de esta cepa es que presenta un sistema NER perfectamente funcional y que es especialmente sensible a la mutagénesis producida por agentes oxidativos (Koch, *et al.* 1996; Levin *et al.* 1982). De hecho, fue obtenida por el grupo de Ames para detectar a este tipo de agentes mutagénicos, dada la baja sensibilidad de las demás cepas de ensayo frente a estos compuestos.

Junto a la cepa TA102, hay otras como la TA104 y TA2659 que también son portadoras de la mencionada mutación *hisG428*, si bien ésta se localiza en el cromosoma. Ambas cepas se diferencian porque la primera es portadora del plásmido pKM101.

Como se ha comentado anteriormente, fue utilizando la cepa TA102 como se demostró la capacidad mutagénica de la familia de las quinolonas en bacterias. Los primeros estudios se basaron en resolver el paradigma del hecho de que las quinolonas fueran conocidos agentes inductores del sistema SOS, pero no mutagénicos (Phillips, *et al.* 1987; Piddock, *et al.* 1987; Ysern, *et al.* 1990). Dicho paradigma quedó resuelto cuando se obtuvieron datos concluyentes sobre su mutagénesis en la cepa TA102. No obstante, estos resultados promovieron una serie de preguntas sobre los mecanismos de mutagénesis de estos compuestos antibacterianos y sobre el tipo o tipos de lesiones que producían. Así, algunas de estas preguntas fueron, ¿Por qué las quinolonas producen mutaciones en una determinada cepa y no en otras?, ¿Cuál es su espectro de mutación?, ¿Son agentes oxidativos?.

Para abordar la primera cuestión, se comparó el fenotipo de la cepa TA102 con las cepas no sensibles a la mutagénesis mediada por quinolonas, observándose que dicha cepa presentaba una mayor permeabilidad, un sistema NER funcional, el operon *mucAB* y la diana mutacional en un plásmido multicopia. A través de diferentes estudios se demostró que para detectarse el efecto mutacional de las quinolonas, las bacterias debían poseer un sistema NER funcional y los genes *mucAB*, codificados en el plásmido pKM101. Así, cepas portadoras de la diana mutacional *hisG428* eran mutables por quinolonas aún cuando dicha diana estuviera en el cromosoma y presentaba una permeabilidad normal, si bien en éstos el número de revertientes era menor (Clerch, 1995). Asimismo, se demostró que cepas con otras dianas mutacionales, como *hisG46* son mutables por quinolonas si poseen los dos requerimientos comentados anteriormente (Ysern, *et al.* 1990; Clerch, 1995). Estos resultados sugerían que las quinolonas deben introducir una lesión premutagénica que, si se procesa a través del sistema NER, permite que la polimerasa tendente al error MucAB actúe y, como consecuencia, se generen mutaciones. Además, y dado que, dianas mutacionales diferentes de

*hisG428*, eran también mutables, se pensó que las quinolonas no eran probablemente agentes oxidativos, si bien no se descartó que pudieran generar algún compuesto de este tipo.

Por otra parte, se demostró que estos agentes antibacterianos poseen un amplio espectro mutacional. Así, introducen tanto sustituciones de bases, como corrimientos del marco de lectura y en todos los casos se requieren las actividades NER y MucAB, a excepción de las inserciones/delecciones en la diana *hisD3052*, las cuales son independientes de MucAB (Clerch, *et al.* 1996a).

En atención a lo indicado anteriormente, parecían haberse elucidado los mecanismos de mutagénesis de estos compuestos, si bien poco se sabía sobre el tipo o tipos de lesión y la capacidad oxidativa de estos antibacterianos.

Sin embargo, utilizando cepas de *E. coli*, auxotrofas para triptófano (Blanco, *et al.* 1998b; Mortelmans, 2000), y estudiando la capacidad mutagénica de las quinolonas en un fondo *uvrA*<sup>-</sup>, se observó que estos compuestos son capaces de introducir mutaciones en dichas cepas (Watanabe, *et al.* 1998a; Watanabe, *et al.* 1998b; Martínez, *et al.* 2000). Ello, evidentemente cuestiona el requerimiento de un sistema NER funcional completo para que tenga lugar la mutagénesis. En esta línea, recientemente y a través de estudios genómicos realizados con algunas de las diferentes cepas de *S. enterica* Serov. Typhimurium que integran el ensayo de retromutación en *Salmonella*, se ha demostrado que la delección *uvrB* está dentro de una región deleccionada que comprende de 14 a 125 kb dependiendo de la cepa (Tabla 6) (Porwollik, *et al.* 2001). Entre los genes deleccionados, además del *uvrB*, se encuentran algunos de los involucrados en la biosíntesis de cofactores de molibdeno (*mod*, *moa*, *moe*) y otros como el operon galactosa o el biotina, además de genes de función desconocida (Cebula y Koch, 1990; Maupin, *et al.* 1995; De Marini, *et al.* 2000; Kozmin, *et al.* 2000; Ataya, 2001; Porwollik, *et al.* 2001). Estos resultados, junto con los obtenidos en *E. coli*, ponen en cuestión el papel del sistema NER como integrante del mecanismo de mutagénesis de las quinolonas. De hecho, y en relación con la mutagénesis inducida por otros compuestos como 6-hidroxi laminopurinas (*N*-6-hidroxiadenina) (HAP) y la 2-amino-6-hidroxi laminopurina (AHAP), se ha mostrado que ambos presentan una mayor actividad mutagénica en

cepas de *S. enterica* Serov. Typhimurium con una delección en la región *uvrB* que en cepas de *E. coli* que poseen mutaciones puntuales en *uvrB* y *uvrA*, habiéndose sugerido que tal vez la delección que afecta a los genes de biosíntesis de cofactores de molibdeno puede ser la causa de esta mayor sensibilidad a la mutagénesis (Kozmin, *et al.* 2000).

**Tabla 6.-** Análisis de cinco cepas de *Salmonella enterica* Typhimurium con el gen *uvrB* deleccionado, obtenidas por selección de resistencia al clorato.

Cepa de <i>Salmonella Typhimurium</i>	Diana Mutacional de Reversión	N° de Genes deleccionados colindantes a <i>uvrB</i>	Bases (Kb) involucradas en la $\Delta$ <i>uvrB</i>	Pérdida (%) por delección en Genoma
TA100 TAQ100	<i>hisG46</i>	47	50 kb	1%
TA1537	<i>hisC3076</i>	87	96 kb	1,9%
TA98	<i>hisD3052</i>	110	125 kb	2,6%
TA97 TA104	<i>hisG428</i>	15	14 kb	0,3%

## *II.- OBJETIVOS*

En atención a lo indicado anteriormente sobre la importancia de las quinolonas en el control de las enfermedades infecciosas y sobre el estado actual del conocimiento de su efecto mutagénico en bacterias, el objetivo general del presente trabajo ha sido profundizar en los mecanismos de mutagénesis de estos compuestos y determinar su potencial mutagénico en bacterias. Para ello, los objetivos concretos planteados han sido:

1. Estudiar la posibilidad de que algunas regiones genómicas colindantes a la delección  $\Delta uvrB$ , como el operon *moa* (genes *moaA*, *moaB*, *moaC*, *moaD* y *moaE*), puedan modular la mutagénesis por ciprofloxacina.
2. Analizar el requerimiento de UvrA y UvrB en la mutagénesis por ciprofloxacina.
3. Analizar si las quinolonas generan algún tipo de lesión oxidativa.
4. Determinar el potencial mutagénico en bacterias de quinolonas de uso en clínica.

### *III.- MATERIAL Y MÉTODOS*

## 1.- MATERIAL BIOLÓGICO

Las diferentes cepas y plásmidos de *Escherichia coli* y *S. enterica* Typhimurium empleados en el desarrollo de la presente investigación, se describen en las Tablas 7, 8 y 9, donde además se señalan sus características más relevantes, así como su procedencia. Se ha empleado el sistema de nomenclatura recomendado por Demerec y col. (1966), en el cual el genotipo es descrito mediante tres letras minúsculas y para el correspondiente fenotipo se emplean también estas tres letras, pero con la salvedad de que la primera se escribe en mayúsculas.

**Tabla 7.-** Plásmidos empleados en el presente estudio.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	PROCEDENCIA
pGEM <sup>®</sup>	f1 ori, <i>lacZ</i> ( $\alpha$ ), (Ap <sup>R</sup> )	Lab. Promega
pUA199	pACYC177 <sup>®</sup> , con fragmento <i>mucAB</i> (Km <sup>R</sup> ).	Este laboratorio
pUA1029	pGEM <sup>®</sup> con banda de PCR de 2614 pb, que contiene el gen <i>uvrB</i> obtenido mediante los cebadores <i>uvrB</i> up <i>Eco</i> RV y <i>uvrB</i> rv <i>Eco</i> RV; (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
pUA1027	pGEM <sup>®</sup> con banda de PCR de 3450 pb, que contiene el operon <i>moa</i> obtenido mediante los cebadores <i>moaAE</i> up <i>Eco</i> RV y <i>moaAE</i> rv <i>Eco</i> RV; (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
pK184	p15A ori, <i>lacZ</i> ( $\alpha$ ), (Km <sup>R</sup> )	Este laboratorio
pUA1040	pK184 con banda recuperada <i>Sph</i> I / <i>Sac</i> I a partir de pUA1029, que contiene el gen <i>uvrB</i> ; (Km <sup>R</sup> )	Este trabajo
pUA1042	pGEM <sup>®</sup> con banda de PCR de 3,5 Kb, que contiene el operon <i>moa</i> obtenido mediante los cebadores <i>moaAE</i> up <i>Hind</i> III y <i>moaAE</i> rv <i>Hind</i> III; (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
pUA1041	pK184 con banda recuperada mediante <i>Hind</i> III a partir de pUA1042, que contiene el operon <i>moa</i> ; (Km <sup>R</sup> )	Este trabajo

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 8.-** Cepas de *S. enterica* Serovar. Typhimurium empleadas en el presente estudio.

CEPA	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	PROCEDENCIA
LT2	Silvestre.	J. Casadesus
TA98	<i>hisD3052, ΔuvrB, gal, bio, chl1008, rfa 1004</i> / pKM101 (Ap <sup>R</sup> )	B. Ames
TA102	<i>hisΔ(G) 8476; rfa 1027</i> / pAQ1 (Tc <sup>R</sup> ) / pKM101 (Ap <sup>R</sup> )	B. Ames
TA2659	LT2, <i>hisG428, uvrB, gal, bio, chl1057, rfa1028</i>	B. Ames
YG3003	Como TA102 pero <i>mutM<sub>S.t.</sub>::Km<sup>R</sup></i>	T Nohmi
LB5000	LT2, <i>trp, metA, metE, rpsL, flaA</i> , RM <sup>+</sup>	B. Stocker
TW180 / pUA199	<i>hisG428, zea-618::Tn10 umuD1C1</i> (Cm <sup>R</sup> ) / pUA199 (Km <sup>R</sup> )	B. Clerch
TA104	<i>his G428, ΔuvrB, bio, chl1004, galE503, rfa1028</i> / pKM101 (Ap <sup>R</sup> )	B. Ames
LB5000 / pGEM <sup>®</sup>	LB5000 / pGEM <sup>®</sup> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
LB5000 / pK184	LB5000 / pK184 (Km <sup>R</sup> )	Este trabajo
LB5000 / pUA1029	LB5000 / pUA1029 (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
LB5000 / pUA1027	LB5000 / pUA1027 (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
LB5000 / pUA1042	LB5000 / pUA1042 (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
LB5000 / pUA199	LB5000 / pUA199 (Km <sup>R</sup> )	Este trabajo
UA1805	TA2659 / pGEM <sup>®</sup> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
UA1806	TA2659 / pUA199 (Km <sup>R</sup> )	Este trabajo
UA1812	TA2659 / pUA199 (Km <sup>R</sup> ) / pGEM <sup>®</sup> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
UA1813	TA2659 / pUA199 (Km <sup>R</sup> ) / pUA1027 (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
UA1814	TA2659 / pUA199 (Km <sup>R</sup> ) / pUA1029 (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
UA1815	TA2659 / pUA1029 (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
UA1816	TA2659 / pUA1027 (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
UA1817	TA104 / pKM101 (Ap <sup>R</sup> ) / pK184 (Km <sup>R</sup> )	Este trabajo
UA1818	TA104 / pKM101 (Ap <sup>R</sup> ) / pUA1040 (Km <sup>R</sup> )	Este trabajo
UA1819	TA104 / pKM101 (Ap <sup>R</sup> ) / pUA1041 (Km <sup>R</sup> )	Este trabajo

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 9.-** Cepas de *Escherichia coli* empleadas en el presente estudio.

CEPA	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	PROCEDENCIA
DH5 $\alpha$ <sup>®</sup>	$\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hscR17</i> ( $r_k^-$ , $m_x^+$ ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	Sambrook <i>et al.</i> 1998
DH5 $\alpha$ / pGEM <sup>®</sup>	DH5 $\alpha$ / pGEM <sup>®</sup> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
DH5 $\alpha$ / pUA199	DH5 $\alpha$ / pUA199 (Km <sup>R</sup> )	Este trabajo
DH5 $\alpha$ / pK184 <sup>®</sup>	DH5 $\alpha$ / pK184 <sup>®</sup> (Km <sup>R</sup> )	Este trabajo
DH5 $\alpha$ / pUA1029	DH5 $\alpha$ / pUA1029 (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
DH5 $\alpha$ / p1027	DH5 $\alpha$ / pUA1027 (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
DH5 $\alpha$ / pUA1042	DH5 $\alpha$ / pUA1042 (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
DH5 $\alpha$ / pUA1040	DH5 $\alpha$ / pUA1040 (Km <sup>R</sup> )	Este trabajo
DH5 $\alpha$ / pUA1041	DH5 $\alpha$ / pUA1041 (Km <sup>R</sup> )	Este trabajo
IC 185	WP2, <i>lamB</i> <sup>+</sup>	M. Blanco
IC 186	WP2, <i>lamB</i> <sup>+</sup> / pKM101 (Ap <sup>R</sup> )	M. Blanco
IC 187	WP2, <i>uvrA</i>	M. Blanco
IC 188	WP2, <i>uvrA</i> / pKM101 (Ap <sup>R</sup> )	M. Blanco
IC 202	WP2, <i>lamB</i> <sup>+</sup> , $\Delta$ <i>oxyR30</i> / pKM101 (Ap <sup>R</sup> )	M. Blanco
IC 203	WP2, <i>lamB</i> <sup>+</sup> , <i>uvrA</i> , $\Delta$ <i>oxyR30</i> / plásmido pKM101 (Ap <sup>R</sup> )	M. Blanco
IC 3993	WP2, <i>lamB</i> <sup>+</sup> , $\Delta$ <i>umuDC::cat</i> , <i>mutY::Kan</i> ; (Km <sup>R</sup> )	M. Blanco
IC3993 / pKM101	WP2, <i>lamB</i> <sup>+</sup> , $\Delta$ <i>umuDC::cat</i> , <i>mutY::Kan</i> / pKM101 (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo
ZA700	<i>trpE65</i> , <i>uvrA135</i> , <i>malB15</i> , <i>ton-1l</i> , <i>sulAI</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> , $\Delta$ <i>soxRS901</i> , <i>zfc2204::10km</i>	T. Kato
ZA700 / pKM101	ZA700 / pKM101 (Ap <sup>R</sup> )	Este trabajo

## **2.- ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS**

### **2.1.- ENSAYO DE RETROMUTACIÓN EN *S. enterica* Typhimurium**

Este sistema de ensayo biológico fue desarrollado por Ames y col. en el año 1975 (Universidad de Berkeley, California), siendo revisado posteriormente por Maron y Ames en el año 1983. En la actualidad es uno de los más recomendados por distintas agencias reguladoras, tanto americanas como europeas para la evaluación mutagénica de productos químicos, fitosanitarios, farmacéuticos, alimentarios y además recomendada para la evaluación de mutagénesis de muestras complejas y medio ambientales (Maron y Ames, 1983).

El principio del ensayo se sustenta en la utilización de diversas cepas de *S. enterica* Typhimurium que son auxótrofas para la histidina, cuantificándose el número de revertientes His<sup>+</sup> inducidos por el tratamiento con agentes químico o físicos (Maron y Ames, 1983; Mortelmans, *et al.* 2000). Para ellos se emplean técnicas y métodos microbiológicos básicos, donde las diferentes cepas de *S. enterica* Typhimurium son cultivadas tanto en medios sólidos como líquidos, ya sea para la conservación o ejecución del ensayo, utilizando tanto medios nutritivos (Nutrient Broth N°2, LB), como medios mínimos (Vogel Bonner E).

#### **Comprobación de las características fenotípicas de las Cepas de *S. enterica* Typhimurium**

Previa a la ejecución del ensayo de retromutación, es necesaria la debida comprobación fenotípica de las cepas. En primer lugar deben efectuarse cultivos de noche (overnight), que pueden ser obtenidos de dos fuentes: a partir de una colonia(s) aislada(s) de placas máster, o por descongelación de un cultivo conservado a -80°. En el primer caso, la siembra se realiza desde las colonias en 20 ml de medio NB y, en segundo, se incuban 100 µl también en 20 ml de NB. Dependiendo de las características fenotípicas / genotípicas de las cepas, el medio es suplementado con el/los antibióticos correspondientes. Los cultivos son incubados a 37°C y en agitación continua a 150 rpm, durante aproximadamente 16 h.

Posteriormente, para conseguir cultivos en fase exponencial, se realiza una resiembra del cultivo de noche. Para ello, se efectúa una resiembra de 4 ml del cultivo de noche en 16 ml de medio fresco NB, incubándose a 37°C y en agitación, hasta alcanzar una  $DO_{620}$  de 0,9–1,2, que se logra aproximadamente a los 30 min de incubación.

Asimismo, con el objeto de obtener cultivos permanentes, las cepas de *S. enterica* Typhimurium cultivadas en NB (overnight), se dispensaban 9,5 ml en tubo de ensayo estéril; al cual se le adicionaba 0,5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotector, procediéndose a homogenizar en vórtex y distribuyendo (0,5 ml) en viales criogénicos estériles. Estos se congelan a -80°C por tiempo indefinido. A la vez, se preparan placas máster, las que pueden ser usadas de modo rutinario durante los ensayos. Para ello, son sembradas por estrías en medio nutritivo NB o LB y medio mínimo Vogel Bonner E, este último suplementado con trazas de histidina / biotina y, dependiendo del tipo de cepa se suplementa previamente con el antibiótico correspondiente. Las placas son selladas con parafilm para evitar su desecación y reducir el riesgo de contaminación y se incuban 24 h (placas de NB) ó 48 h (placas de Vogel Bonner E). Finalmente se conservan a 4°C por un periodo máximo de dos meses.

### □ Requerimientos de Histidina y Biotina

El carácter *his<sup>-</sup>* y *bio<sup>-</sup>*, se confirma sembrando en placas de Vogel Bonner E, suplementadas con histidina y/o biotina y en placas carentes de estos nutrientes (Maron y Ames, 1983; Mortelmans, 2000), siguiendo el diseño que se muestra a continuación:

Suplementos:	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4
Solución de Histidina 0,1 M	100 µl	-	100 µl	-
Solución de Biotina 0,5 mM	-	100 µl	100 µl.	-

Se siembra por estría y las placas se incuban a 37°C durante 24 h y se verifica los requerimientos señalados, utilizando la cepa LT2 como control.

### □ **Detección de la Mutación *rfa***

Muchas cepas de este ensayo presentan una mayor permeabilidad celular, debido a una mutación (*rfa*<sup>-</sup>) que posibilita la pérdida parcial de lipopolisacáridos de la pared celular, elevando así la sensibilidad del ensayo (Maron y Ames, 1983; Mortelmans, 2000). Esta característica fenotípica se confirma a través de la sensibilidad al cristal violeta. Para ello, es sembrada en confluente la cepa en estudio, mediante la incorporación de un inóculo de 100  $\mu$ l en el agar de superficie, previamente licuado a 48°C, el cual es vertido sobre la superficie del agar nutritivo LB y se deja solidificar a temperatura ambiente por unos minutos. Posteriormente, se deposita en el centro de la placa un disco de papel de filtro (Whatman N°1) de 5 mm de diámetro, al que se añaden 10  $\mu$ l de una solución de cristal violeta. Las placas se incuban 24 h a 37°C y las cepas portadoras de este carácter *rfa* presentan una inhibición de crecimiento superior a 14 mm de diámetro.

### □ **Presencia de la Delección *uvrB***

Otra característica de algunas cepas de este ensayo es que muestran una alteración en el sistema de reparación por escisión, producto de la delección del gen *uvrB*. (Maron y Ames, 1983; Mortelmans, 2000). Su confirmación se realiza evaluando la sensibilidad de estas cepas a la radiación ultravioleta de 254 nm de longitud de onda. En este caso, una placa Petri con agar LB se divide en 25 cuadrantes (5 por lado), depositándose en cada uno de ellos 5  $\mu$ l de la suspensión bacteriana a examinar a lo largo de una columna. De modo similar se procede con las otras cepas a ensayar en las columnas anexas, salvo la columna central que generalmente está reservada para la cepa control LT2. Se secan las placas y se expone la primera fila a la irradiación UV durante 5 s (3,5 J/m<sup>2</sup>). Seguidamente, y de modo progresivo se irradia por 5 s más cada una de las filas subsiguientes, a excepción de la última fila que queda sin irradiar. Se incuba la placa 24 h a 37°C, al término del cual, debe detectarse una mayor sensibilidad (escaso crecimiento) en todas aquellas que eran portadoras de la delección *uvrB*, frente al control LT2.

□ **Presencia del Plásmido pKM101**

Finalmente, diferentes cepas de este ensayo son portadoras del plásmido pKM101, el que se caracteriza por contener el operon *mucAB* y el gen *bla* que confiere resistencia a la ampicilina. Para determinar su presencia, se suplementa con ampicilina una placa de agar LB a una concentración final de 25 µg/ml, en la cual se siembra la cepa en estudio, teniendo como control la cepa LT2. Se incuba la placa a 37°C durante 24 h, debiendo existir crecimiento en aquellas cepas portadoras del plásmido pKM101 (Ej.: TA98).

□ **Controles Positivos**

En cada experiencia se incluyen controles positivos (mutágenos conocidos) que confirman las propiedades de reversión de cada cepa. Estas frecuencias de reversión son relativamente constantes en el curso del tiempo. Regularmente en nuestro trabajo, por las características de las cepas empleadas, los agentes mutagénicos para la comprobación de cepas de *S. enterica* Typhimurium fueron el peróxido de hidrógeno y el hidróxido de cumeno.

**Ejecución del Ensayo : Método de Incorporación en Placa**

Se ha utilizado el método de incorporación en placa, el cual consiste en la mezcla de tampón fosfato, muestra problema, cepa de ensayo, con el agar de superficie licuado a 48°C, el cual previamente es suplementado con trazas de histidina / biotina, tal como es señalado a continuación:

<b>Componentes</b>	<b>CE</b>	<b>C(+)</b>	<b>C(0)</b>	<b>X</b>
Tampón Fosfato	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
H <sub>2</sub> O (MQ)	100 µl		100 µl	
Mutágeno		100 µl		
Muestra Problema	100 µl			100 µl
Cepa Bacteriana		100 µl	100 µl	100 µl
Agar de Superficie	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml

Donde: CE = Control de Esterilidad  
C(+) = Control Positivo

C(0) = Control Negativo  
X = Muestra a ensayar

Todo esto es agitado en vórtex 3 s y vertido sobre la superficie de placas de medio mínimo Vogel Bonner E. (Maron y Ames, 1983; Mortelmans, 2000). Se incuban a 37°C durante 66-72 h y se efectúa la cuantificación de revertientes de cada una de las placas.

Los resultados pueden expresarse cuantitativamente de distintas formas, la que se ha optado en este trabajo es la expresada como índice mutagénico (IM).

$$IM = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Revertientes de la muestra problema}}{\text{N}^\circ \text{ de Revertientes del control negativo.}}$$

Si el IM es menor de 2, la muestra es considerada negativa y si es dos veces superior al número de revertientes espontáneos, se considera positiva (Maron y Ames, 1983; Mortelmans, *et al.* 2000).

### **2.2.- ENSAYO DE RETROMUTACIÓN EN *Escherichia coli***

Este es un sistema de ensayo de retromutación en el que se cuantifica la reversión a Trp<sup>+</sup>, utilizándose la cepa WP2 de *E. coli*, así como otras derivadas de ella (Mortelmans, 2000). De igual modo al ensayo anterior, también este sistema es recomendado por numerosos agencias reguladoras (Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), International Conference on Harmonisation (ICH), Japanese Mistry of Health and Welfare y United States Environmental Protection Agency Health Effects test Guidelines, así como grupos como International Workshop on the Standarization of Genotoxicity Test Procedures).

El procedimiento experimental a seguir para la realización de este ensayo, es muy similar al indicado anteriormente para *S. enterica* Typhimurium, pero con las siguientes variaciones:

Para la obtención de cultivos permanentes, las cepas de *E. coli* WP2 se cultivan en medio LB (cultivo de noche) y se añade en glicerol (Panreac) estéril como agente crioprotector, hasta lograr una concentración final del 30% de cultivo.

Se reparten alícuotas de 0,5 ml en viales crioprotectores para su posterior almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En la obtención de placas máster se efectúa sobre medio LB y/o NB, Vogel Bonner E, suplementado con triptófano y el antibiótico adecuado si lo requiere la cepa.

La comprobación de las características fenotípicas de la cepa se realiza determinando la auxotrofia para el triptófano. Para ello, se efectúa un cultivo de noche de la cepa en cuestión, la cual se siembra sobre la superficie de dos placas de Vogel Bonner E, una de ellas, suplementada con triptófano (10-20  $\mu\text{g/ml}$ ), y la otra carente del aminoácido. Tras incubar 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ , debe observarse falta de crecimiento en la placa que carece de triptófano y crecimiento masivo en la placa que lo contiene.

De modo similar a lo comentado en el apartado anterior, se comprueba la presencia del marcador *uvrA* mediante la sensibilidad a la irradiación ultravioleta, teniendo como control la cepa de *E. coli* WP2. En cuanto a la ejecución del ensayo, la principal diferencia radica en que la suplementación con triptófano es realizada durante la preparación del medio mínimo Vogel Bonner E y no sobre el agar de superficie.

### 2.3.- MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y TAMPONES EMPLEADOS EN LOS SISTEMAS DE ENSAYOS

#### □ Medio LB (*Luria Bertrani*)

A.- Empleo: Como medio de enriquecimiento de cepas, preparación de placas master, etc.

B.- Componentes:

B.1. Triptona (Pronadisa).	10 g
B.2. Extracto de Levadura (Pronadisa).	5 g
B.3. NaCl.	10 g
B.4. H <sub>2</sub> O destilada.	950 ml

C.- Preparación:

C.1. Verter los componentes en el agua destilada.

C.2. Agitar hasta su completa disolución.

C.3. Ajustar el pH a 7,5 con NaOH (5N).

C.4. Esterilizar en autoclave a  $120^{\circ}\text{C}$  por 15 min.

En caso de preparación de medio sólido, se adicionan 17 g de agar agar.

### □ **Medio NB (Nutrient Broth Oxoid N°2)**

A.- Empleo: Para efectuar los cultivos de noche y resiembras de cepas a ensayar, tanto de *S. enterica* Typhimurium como de *E. coli* WP2.

B.- Componentes:

B.1. Medio Nutritivo NB Oxoid N°2 (Oxoid).	25 g
B.2. H <sub>2</sub> O destilada.	1000 ml

C.- Preparación:

- C.1. Añadir en matraz el medio NB Oxoid N°2 y 1000 ml de agua destilada y agitar hasta disolución.
- C.2. Repartir aproximadamente 50 ml en botellas de 100 ml.
- C.3. Autoclavar 15 min a 121°C.
- C.4. Rotular y guardar a 4°C después de comprobar su esterilidad (incubando las botellas a 37°C por 24 h).

Nota : Para la preparación de medio sólido, se añade agar agar 15-17g/l a los componentes indicados. La solución se agita y calienta hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave (121°C por 15 min) y se reparten en placas Petri estériles (20 ml/placa).

### □ **Solución de Glucosa al 40%**

A.- Empleo: Como fuente carbonada en preparación de medio Vogel Bonner – E glucosado.

B.- Componentes:

B.1. Glucosa monohidratada (PM = 198,17, Merck 8342).	440 g
B.2. H <sub>2</sub> O destilada.	1000 ml

C.- Preparación:

- C.1. Pesar y depositar la glucosa en un vaso de precipitación de 2000 ml de capacidad.
- C.2. Añadir 1000 ml de agua destilada y disolver completamente con ayuda de un agitador magnético, calentando la solución a 40°C.
- C.3. Repartir 50 ml en botellas de 100 ml.
- C.4. Autoclavar por 20 min a 121°C.
- C.5. Rotular y guardar a 4°C después de comprobar su esterilidad (incubando las botellas a 37°C por 24 h).

### □ **Solución Salina de Vogel – Bonner E (X50)**

A.- Empleo: Aporte de sales en preparación de medio mínimo Vogel Bonner-E.

B.- Componentes:

B.1. MgSO <sub>4</sub> X 7H <sub>2</sub> O (PM = 246,37).	08 g
B.2. Acido Cítrico Monohidratado (PM =210,12).	80 g
B.3. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro) PM = 176,23).	400 g
B.4. NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> X 4H <sub>2</sub> O (PM = 209,07).	140 g
B.5. H <sub>2</sub> O destilada (a 45°C).	520 ml

C.- Preparación:

- C.1. Se añade la primera sal a 520 ml de agua destilada (a 45°C) en un recipiente de 2000 ml de capacidad. Se agita calentando como máximo a 60°C.
- C.2. Disuelta completamente la glucosa, se añade la siguiente sal, hasta conseguir su disolución total.
- C.3. Este procedimiento se repite para cada uno de los componentes.
- C.4. Ajustar el volumen a 1000 ml y repartir 20 ml en botellas de 100 ml.
- C.5. Autoclavar 20 min a 121 °C.
- C.6. Rotular y almacenar a temperatura ambiente.

### □ **Medio mínimo Vogel – Bonner E con Glucosa**

A.- Empleo: Como medio mínimo glucosado, durante ensayo de retromutación; tanto para *S. enterica* Typhimurium como para *E. coli* WP2

B.- Componentes:

B.1. Agar agar (Difco).	17 g
B.2. Medio Salino Vogel Bonner E (x 50).	20 ml
B.3. Glucosa estéril al 40%.	50 ml
B.4. H <sub>2</sub> O (MQ).	930 ml

C.- Preparación:

- C.1. Esterilizar en un matraz de preparación de medios de cultivo, el agua junto con el agar-agar, autoclavando por 20 min a 121°C.
- C.2. Dejar atemperar hasta 50°C.
- C.3. En la cabina de flujo laminar, añadir estérilmente la solución salina de Vogel Bonner E (X50) y la solución de glucosa; los cuales previamente han sido atemperados a 45°C. Agitar.
- C.4. Repartir en placas Petri estériles (20 ml/placa) y dejar enfriar.
- C.5. Rotular y guardar a 4°C (un máximo de 7 días), después de comprobar su esterilidad (manteniendo las placas a 30°C por una noche).

### □ **Agar Blando de Superficie (Top Agar)**

A.- Empleo: Durante ensayos de mutagénesis, como vehículo de incorporación de la muestra, así como trazas de histidina / biotina para ensayos con *S. enterica* Typhimurium.

B.- Componentes:

<b>Top Agar</b>	1,0 X
Agar Agar	6 g
NaCl	5 g
Agua Destilada	1000 ml

C.- Preparación:

- C.1.- Adicionar cada uno de los componentes y calentar hasta aproximadamente 50°C, agitando hasta conseguir la completa disolución de sus componentes.
- C.2.- Repartir aproximadamente 50 ml en botellas de 100 ml de capacidad.
- C.3.- Autoclavar 20 min a 121°C.
- C.4.- Rotular y almacenar a 4°C durante un periodo máximo de 15 días.

□ **Trazas de Biotina / Histidina 0,5 mM**

A.- Empleo: Para suplementar placas de Vogel Bonner-E, a través del agar de superficie (top agar) durante ensayo de retromutación en cepas de *S. enterica* Typhimurium

B.- Componentes: Estas proporciones obedecen para 250 ml.

B.1. D – biotina (PM = 244,3) (Sigma B-4501).	30,5 mg
B.2. L – histidina (PM = 155,2) (Sigma H-8000).	19,4 mg
B.3. H <sub>2</sub> O destilada.	250 ml

C.- Preparación:

- C.1.- Disolver la biotina en aproximadamente 100 ml de agua destilada, calentando hasta ebullición.
- C.2.- De modo independiente, disolver la histidina en aproximadamente 100 ml de agua destilada, a temperatura ambiente.
- C.3.- Mezclar las dos soluciones.
- C.4.- Ajustar el volumen a 250 ml.
- C.5.- Repartir de 30–50 ml en botellas de 100 ml.
- C.6.- Esterilizar en autoclave por 20 min a 121°C, o a través de un filtro de membrana de 0,45 µm de tamaño de poro.

□ **Tampón Fosfato Sódico 0,2 M (pH 7,4)**

A.- Empleo: Durante el ensayo, como solución amortiguadora para los productos a analizar durante los ensayos de retromutación.

B.- Componentes: De forma independiente preparar:

B.1. Solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 M.

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> X H <sub>2</sub> O (PM = 137,99) (Merck 6346.0500)	8,3 g
H <sub>2</sub> O destilada.	300 ml

B.2. Solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 M.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (PM = 141,96) (Merck 6586.0500)	14,2 g
H <sub>2</sub> O destilada.	500 ml

C.- Preparación:

- C.1.- Se añaden aproximadamente unos 250 ml de la primera solución a 500 ml de la segunda, hasta obtener un pH de 7,4
- C.2.- Se reparten aproximadamente 50 ml en botellas de 100 ml de capacidad.
- C.3.- Autoclavar por 20 min a 121°C.
- C.4.- Rotular y guardar a 4°C.

**Soluciones para el Control Fenotípico**

□ **Solución de Cristal Violeta al 0,1%**

A.- Empleo: En la detección de la presencia o ausencia de la mutación *rfa*<sup>-</sup> en cepas a ensayar, tanto de *S. enterica* Typhimurium como de *E. coli* WP2.

B.- Componentes:

- B.1. Cristal Violeta. 0,1 g  
 B.2. Agua destilada. 100 ml

C.- Preparación:

- C.1. Disolver el producto completamente.  
 C.2. Conservar a 4°C, protegido de la luz.

□ **Solución de Antibióticos**

Antibiótico	Conc. Stock (mg/ml)	Conc.Trabajo (mg/ml)	Conc.Final en Placa (µg/ml)	Solvente
Ampicilina (Roche)	50	5	25	H <sub>2</sub> O
Kanamicina (Roche)	50	5	25 – 50*	H <sub>2</sub> O
Tetraciclina (Roche)	2	0,2	2	H <sub>2</sub> O

(\*) para *E. coli*

- 1.- Preparar las soluciones.
- 2.- Esterilizar por filtración, a través de un filtro de membrana de 0,22 µm.
- 3.- Rotular y guardar a 4°C.

□ **Solución de Histidina 0,1 M**

A.- Empleo: Para suplementar placas con medio mínimo Vogel Bonner E, permitiendo la comprobación fenotípica de cepas a ensayar y durante preparación de placas máster.

B.- Componentes:

- B.1. L – histidina (PM = 155,2)(Sigma H-8000). 15,5 mg.  
 B.2. H<sub>2</sub>O destilada. 1 ml

C.- Preparación:

- C.1. Disolver completamente la histidina.  
 C.2. Esterilizar por filtración, a través de un filtro de membrana 0,22 µm.  
 C.3. Rotular y almacenar a 4°C, durante un periodo máximo de 30 días.

□ **Solución de Biotina 0,5 mM**

A.- Empleo: Para suplementar placas con medio Vogel Bonner E glucosado, permitiendo la comprobación fenotípica de las cepas a ensayar. Asimismo, en la preparación de placas máster.

B.- Componentes:

- B.1. D – biotina (PM = 244,3) (Sigma B-4501). 2,4 mg  
 B.2. H<sub>2</sub>O destilada. 20 ml

C.- Preparación:

- C.1. Disolver completamente la histidina.  
 C.2. Esterilizar por filtración, a través de un filtro de membrana 0,22 µm.  
 C.3. Rotular y guardar a 4°C, durante un periodo máximo de 30 días.

□ **Solución de Triptófano**

A.- Empleo: Suplementación de medio mínimo Vogel Bonner E durante ensayos en sistema *E. coli* WP2

B.- Componentes:

B.1. L-Triptófano (Sigma).	10 mg
B.2. H <sub>2</sub> O (MQ).	10 ml

C.- Preparación:

- C.1. Disolver el triptófano en el volumen de agua señalado.
- C.2. Esterilizar por filtración, empleando filtro de membrana millipore de 0,22 μ de tamaño de poro
- C.3. Almacenar a 4°C.

### 3.- MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GENÉTICA

#### 3.1.- CONJUGACIÓN BIPARENTAL

La conjugación bacteriana es un proceso biológico en el que se produce la transferencia de material genético de una célula donadora a otra receptora, mediante el contacto célula a célula (Maniatis, *et al.* 1982).

La transferencia de genes mediante conjugación está codificada en ciertos tipos de plásmidos; algunos de ellos pueden integrarse al cromosoma bacteriano y duplicarse como cualquier otro gen cromosómico (episomas), otros permiten realizar el contacto entre células pero no pueden transferir su DNA (plásmidos conjugativos pero no movilizables (Tra<sup>+</sup> Mob<sup>-</sup>)) y por el contrario, pueden ser no conjugativos pero movilizables (Tra<sup>-</sup> Mob<sup>+</sup>). Los plásmidos que tienen ambas características, conjugativos y movilizables (Tra<sup>+</sup> Mob<sup>+</sup>), se denominan auto-transferibles. Los plásmidos no conjugativos pero movilizables pueden ser eficientemente transferidos a células receptoras, cuando en la célula donadora existen otros plásmidos conjugativos que permiten el contacto célula-célula (Perera, *et al.* 2002a).

#### Protocolo

1. Efectuar un cultivo de la cepa portadora del plásmido movilizable, en 10 ml de medio LB, conteniendo el (los) antibiótico(s) según la cepa. De modo paralelo, efectuar otro cultivo con la cepa receptora.

2. Realizar una resiembra 1:10 de la cepa donadora en medio fresco, durante 1–2 h para asegurar un cultivo en fase exponencial ( $10^8$  cfu/ml).
3. Mezclar 100  $\mu$ l de cada cultivo en un tubo Eppendorff estéril y centrifugar durante 20 s.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender la mezcla de células en 100  $\mu$ l de  $MgSO_4$  10 mM estéril.
5. Depositar un filtro de nitrocelulosa estéril (0,45  $\mu$ m de diámetro de poro) sobre la superficie de una placa de LB seca; y sobre ella, 100  $\mu$ l de la mezcla. Dejar secar por unos minutos en cámara de flujo laminar.
6. Incubar las placas en estufa durante 6–8 h a la temperatura apropiada de la cepa receptora.
7. Resuspender el filtro con ayuda del vórtex, en 3 ml de  $MgSO_4$  10 mM (o NaCl 0,9%).
8. Sembrar 100  $\mu$ l de la suspensión, en placas con medio suplementado con el (los) antibiótico(s) adecuados.

### 3.2.- ELECTROPORACIÓN

La electroporación es la transferencia de moléculas de DNA al interior de la célula procariota basado en la utilización de descargas eléctricas que producen cambios físicos-bioquímicos; alterando entre otras propiedades, el potencial de membrana, produciendo desorganizaciones y roturas transitorias, que hacen que la célula sea permeable a distintas macromoléculas (y permitir el paso de DNA exógeno) (Maniatis, 1982). La formación de poros fue postulada como una explicación del fenómeno y del cual deriva el nombre de la técnica (Sambrock, *et al.* 1989; Perera, *et al.* 2002a).

Inicialmente se diseñó para efectuar transformaciones en células eucariotas y no fue sino hasta 1987 en que Bill Dower (de la Cia. Bio-Rad Laboratories) demostró que era capaz de transformar células de *E. coli* con alta eficiencia. Los parámetros físicos más importantes a tener en cuenta para optimizar la eficiencia son el voltaje aplicado y la constante de tiempo del pulso. Típicamente, el campo aplicado oscila entre 6-12 kV/cm, pero cada bacteria necesita un óptimo. La fracción de células que sobrevive después del pulso eléctrico decrece a medida que el voltaje aumenta. En lo que atañe a las propiedades de las bacterias, la composición de la membrana y el espesor, densidad y estructura de la pared son

los aspectos que más influyen en el éxito del proceso; así como el propio medio en que van a ser conservadas y electroporadas (Dower, *et al.* 1988; Perera, *et al.* 2002a).

Este es un método que produce altos rendimientos (entre  $10^9$ - $10^{10}$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA, con un 80% de supervivientes en *E. coli*) y sobre todo, que puede ser aplicado a muy distintos tipos de células, bacterianas y eucariotas.

### Obtención de Células Competentes

La competencia es el estado fisiológico característico que permite captar DNA del medio exterior, éste es diferente para cada especie capaz de experimentar transformación y dentro de cada especie está influido por una serie de factores (densidad celular, temperatura, pH, nutrientes, etc) (Maniatis, *et al.* 1982; Sambrock, *et al.* 1989).

#### Protocolo (según Dower y col, 1989)

1. Preparar el día anterior, lo siguiente:
  - 01 l de medio LB, conteniendo solo el 50% de NaCl (5 g/l) de su concentración adecuada.
  - 02 l de agua MQ estéril (01 l en cada botella) y almacenarla a 4°C.
  - Esterilizar 4 tubos de polipropileno de 250 ml cada uno y guardar a 4°C.
  - Esterilizar dos tubos de 30 ml de capacidad y almacenarlos a 4°C.
  - Efectuar el cultivo de noche en 10 ml de LB, suplementado si lo requiere con el/los antibiótico(s) de acuerdo al fenotipo de la cepa.
2. Efectuar una resiembra 1:100 mediante inóculo de 10 ml del cultivo de noche al litro de LB, e incubar a 37° hasta alcanzar una  $DO_{550}$  de :
  - 0,6 :  $rec^+$ , DH5
  - 0,2-0,3 :  $recA^+$ , Salmonella.
3. Dejar reposar durante 15 min a 4°C (o en todo caso distribuirlos directamente en los tubos de polipropileno preenfriados 4°C).
4. Distribuir a los tubos de polipropileno de 250 ml.
5. Centrifugar a 6000 rpm durante 10 min a 4°C, en una centrífuga Beckman J2-21.
6. Eliminar el sobrenadante y resuspender (vórtex) en un 1l de agua MQ estéril (250 ml en cada tubo).
7. Centrifugar nuevamente a 6000 rpm durante 10 min.

8. Repetir el paso 6 y 7.
9. Eliminar el sobrenadante y resuspender en un volumen 1/50 del inicial, en glicerol al 10%, frío y estéril (20 ml de glicerol al 10% frío y estéril, es decir 5 ml. en cada tubo).
10. Pasar a un tubo de 30 ml y centrifugar a 4000 rpm durante 15 min a 4°C.
11. Eliminar el sobrenadante y resuspender 1/1000 del volumen inicial en glicerol (1 ml. de glicerol al 10% frío y estéril). En este momento la concentración celular es aproximadamente de  $1-2 \times 10^{10}$  cfu/ml.
12. Distribuir 50  $\mu$ l en tubos Eppendorff y pasarlos rápidamente a nieve carbónica.
13. Almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se obtiene una concentración aproximada de  $1,5 \times 10^{10}$  cfu/ml.

### Protocolo de Electroporación según Bio-Rad

Preparación :

1. Tener en hielo el siguiente material:
  - *Tubos (180 x 11) con medio de cultivo BHI.*- Tantos mililitros como cubetas a electroporar + 1 ml que servirá de control de esterilidad.
  - *Células Competentes.*- Descongelar las células competentes que se hallan a  $-70^{\circ}\text{C}$ , pasándola a  $4^{\circ}\text{C}$ ; evitando en lo posible el cambio brusco de temperatura.
  - *Cubetas de electroporación (Biolabs).*- Se emplean cubetas de 0,2 cm de diámetro interno, las cuales deben haber sido irradiadas por 15–30 min con luz ultravioleta, de modo que queden estériles y luego almacenarlas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.
  - *Electroporador (Gene Pulser Apparatus Bio-Rad).*- El cual debe estar programado con las siguientes especificaciones:
    - Capacitancia: 25  $\mu\text{FD}$
    - Resistencia: 200  $\Omega$
    - Voltaje: 2,0 Kv
  - *DNA.*- Si el DNA a electroporar procede de una ligación, debe ser inactivada la ligación a  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 min.
    - En ciertas ocasiones, dado la alta concentración de sales presentes en las digestiones producto de los tampones de las enzimas de restricción, es necesario dializar las digestiones y de esta manera evitar que durante el proceso de electroporación (pulso eléctrico) halla corto circuito.
    - En este caso, se prepara una placa Petri con agua (MQ), en la que se suspende sobre su superficie un pequeño papel filtro de nitrocelulosa estéril (Millipore) de 0,05  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, al que posteriormente con la ayuda de una micropipeta es depositaba en su superficie todo el volumen de la digestión, por un periodo de tiempo de 15-30 min; al término

del cual, nuevamente se recupera la digestión para su posterior electroporación.

2. Bajo condiciones de esterilidad se adicionar el DNA :
  - 2  $\mu$ l de DNA, si es producto reciente de una ligación o
  - 0,2  $\mu$ l de DNA, si se trata de un plásmido (inserto ya incorporado anteriormente en el vector) en el tubo Eppendorff conteniendo las células competentes.
3. Dejar reposar por 15 min en hielo.
4. Con ayuda de una pipeta retirar el contenido del tubo Eppendorff y transferirlo a una cubeta de electroporación; evitando en lo posible al generar burbujas dentro de ella, caso contrario dar pequeños golpes hasta la eliminación completa de éstas.
5. Introducir la cubeta de electroporación dentro del carril del electroporador y desplazarlo hasta la parte posterior.
6. Cargar con pipeta 1 ml de BHI frío y paralelamente pulsar los dos botones de electroporación, hasta la emisión de una señal acústica, la cual indicará la finalización del pulso eléctrico; consiguiéndose de esta forma una intensidad de campo eléctrico de 12,5 Kv/cm ( $E = v/d$ ; donde "v" es el voltaje aplicado y "d" el diámetro interno de cubeta de electroporación).
7. Retirar inmediatamente la cubeta de electroporación del carril de electroporador y verter el ml de medio BHI que habíamos cargado en pipeta; caso contrario, la eficiencia de electroporación disminuirá drásticamente posterior al minuto de electroporar.
8. Retirar el contenido de la cubeta de electroporación y depositarlo en un tubo de 18X mantenido a 4°C.
9. Incubar el(los) tubo(s) por 45 min a 37°C (para expresión fenotípica).
10. Efectuar las diluciones necesarias y sembrar 100  $\mu$ l sobre las placas de LB suplementadas con el (los) agente(s) de selección (antibióticos, Xgal, etc.) que permitirá la selección de clones esperados. Regularmente, antes de hacer la siembra se efectúan diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . La eficiencia de transformación será menor, cuando se trata de ligaciones recién hechas por lo que se recomienda colocar inóculos mayores (500  $\mu$ l).
11. Incubar las placas a 37°C por 24 h.
12. Se recomienda que las cubetas de electroporación deben ser lavadas con agua destilada y posteriormente hacer enjuagues con alcohol (70%) con la ayuda de una pipeta Pasteur. Asimismo se debe tener la precaución de que al término de electroporar haber descendido a 0 el voltaje del electroporador.

### **Soluciones y Medios de Cultivo**

#### **□ Glicerol 10%**

A.- Empleo: Como crioprotector en preparación de células competentes.

### B.- Componentes:

B.1.- H <sub>2</sub> O (MQ).	90 ml
B.2.- Glicerol.	10 ml

### C.- Preparación:

- C.1.- Mezclar el glicerol en agua.
- C.2.- Autoclavar durante 15 min a 121°C.
- C.3.- Almacenar a 4°C.

### □ **Medio BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid)**

A.- Empleo: Como medio de recuperación de bacterias electroporadas y permitir expresión fenotípica

### B.- Componentes:

B.1.- BHI (Oxoid).	37 gr
B.2.- H <sub>2</sub> O (MQ).	1000 ml

### C.- Preparación:

- C.1.- Distribuir en botellas de 100 ml de capacidad.
- C.2.- Esterilizar en autoclave por 15 min a 121°C.

### □ **Solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido (X-gal)**

A.- Empleo: Como componente en preparación de placas LB-Xgal y permitir el revelado cromogénico de clones recombinantes.

### B.- Componentes:

B.1.- X-gal (Apollo Scientific).	50 mg
B.2.- N-dimetilformamida.	1 ml

### C.- Preparación:

- C.1.- Diluir el X-gal en la dimetilformamida en tubo Eppendorff mediante empleo de vórtex.

### □ **Preparación de Placas LB con X-gal**

A.- Empleo: Durante revelado cromogénico de clones recombinantes.

### B.- Componentes

B.1.- Medio LB licuado (+/- 40°C).	1 l
B.2.- Solución de Xgal (50 mg/ml).	1 ml

### C. Preparación:

- C.1.- Verter la solución de X-gal en el medio LB licuado (40°C)(concentración final de 50  $\mu$ g/l).
- C.2.- Agitar y plaqurear.
- C.3.- Dejar enfriar las placas y almacenarlas 4°C.

#### **4.- MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE DNA**

##### **4.1.- PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO**

Los diversos métodos de preparación de plásmidos pueden adaptarse a diferentes volúmenes del cultivo de partida (desde el orden del litro hasta el de ml); se habla de "*maxipreps*", "*midpreps*" y "*minipreps*"; este último capaz de obtener DNA plasmídico a pequeña escala, siendo ampliamente utilizado en el trabajo rutinario de clonaje.

El principio de método se basa en la forma circular del DNA plasmídico y en su pequeño tamaño, para lograr su separación del resto de moléculas de ácidos nucleicos. La lisis celular se consigue mediante la aplicación de diversos agentes (enzimas, álcali, detergentes, disolventes orgánicos, calor). El método clásico se sustenta en la incubación con lisozima, seguida del tratamiento con detergentes (a elevada temperatura o en presencia de álcali). Tras la lisis celular, incluye una incubación en medio alcalino que desnaturaliza el DNA, donde las grandes moléculas de DNA cromosómico adoptan estructuras desorganizadas, lo que dificulta su renaturalización posterior. En cambio, las moléculas pequeñas de DNA plasmídico se reasocian fácilmente, cuando a continuación son llevadas nuevamente a un pH neutro, mediante la adición de una solución con pH ácido. En esta nueva disolución, que incorpora una alta concentración salina, precipita el DNA cromosómico desnaturalizado y proteínas, por lo que una simple sedimentación permite obtener en el sobrenadante las moléculas de DNA plasmídico renaturalizadas y solubles (Sambrock, *et al.* 1989).

##### **4.1.1.- Maxiextracción**

Esta técnica se emplea cuando se requieren elevados volúmenes de DNA. Se suele partir de un litro de cultivo bacteriano y el rendimiento es del orden de los 0,5–5 mg de DNA plasmídico.

### Protocolo

1. Efectuar un cultivo de día (overday) de la cepa en cuestión, en 10 ml de medio LB; al término de la cual, se realiza un cultivo de noche (overnight) efectuando un escalamiento en 100 ml.
2. Pasar el contenido a un tubo de polipropileno de 250 ml de capacidad y centrifugar a 6000 rpm durante 10 min, bajo condiciones de esterilidad.
3. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 4 ml de Solución I, Agitar en vórtex hasta su completa homogenización y pasar el contenido a tubo córex de 30 ml de capacidad.
4. Adicionar 8 ml de Solución II y agitar por inversión.
5. Dejar reposar en hielo durante 5 min.
6. Adicionar 6 ml de Solución III fría y agitar por inversión.
7. Dejar reposar en hielo por 10 min.
8. Centrifugar a 9000 rpm durante 10 min a 4°C.
9. Recuperar el sobrenadante, tratando de no arrastrar componentes sólidos y verterlo en tubo córex de 30 ml de capacidad.
10. Adicionar 0,6 volúmenes de isopropanol. Agitar por inversión y dejar 15 min a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 6000 rpm, durante 10 min a 20°C.
12. Eliminar el sobrenadante por decantación y dejar secar el sedimento a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min, hasta la completa evaporación de restos de isopropanol.
13. Adicionar 1 ml de H<sub>2</sub>O (MQ) mas 10 µl de RNAasa concentrada (20 mg/ml), e incubar en baño de agua a 37°C durante aproximadamente 30 min.
14. Distribuir en tubos Eppendorff, 500 µl en cada uno de ellos; adicionando 1000 µl de tierra de diatomeas y agitar por inversión.
15. Dejar reposar durante 5 min, a temperatura ambiente.
16. Hacer pasar los contenidos a través de una columna (que contiene el disco de filtro).
17. Hacer pasar 3 ml de etanol al 70 % por la columna.
18. Centrifugar a 12000 rpm durante 3 min.
19. Adicionar 50 µl de H<sub>2</sub>O (MQ) caliente (55°C), dejando reposar durante 5 min.
20. Centrifugar durante 5 min
21. Repetir el paso N°18, recuperando el contenido en tubo Eppendorff con tapa.

22. Cargar 1  $\mu$ l en gel de agarosa al 0,7%, para evidenciar concentración.

### 4.1.2.- Miniextracción

#### Protocolo de Lisis Alcalina para *S. enterica* Typhimurium

1. Efectuar un cultivo de noche de *S. enterica* Typhimurium en 5 ml de medio LB, suplementado con los antibióticos de acuerdo a las características genotípicas de la cepa.
2. En tubo Eppendorff, adicionar 1,5 ml del cultivo de noche y centrifugar (Hettich - Zentrifugen / Mikro 12-24) durante un minuto en una centrifuga Eppendorff a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante mediante bomba de aspiración y volver a carga el Eppendorff con 1,5 ml del cultivo de noche, a fin de garantizar un buen volumen de células, volviendo a centrifugar y repetir la succión con bomba.
3. Resuspender el sedimento con 1,5 ml de NaCl 0.9% y centrifugar durante 1 min. Se recomienda efectuar otro lavado nuevamente con NaCl 0.9% a fin de eliminar todo resto de medio de cultivo.
4. Resuspender el sedimento en 50  $\mu$ l de Solución I fría (4°C).
5. Adicionar 50  $\mu$ l de solución I fría que contenga lisozima (10 mg/ml de Solución I) y resuspender completamente en vórtex.
6. Dejar reposar de 5–10 min a temperatura ambiente.
7. Agregar 200  $\mu$ l de Solución II (la cual está a temperatura ambiente) y mezclar por inversión hasta obtener una solución viscosa, pero transparente.
8. Dejar reposar 10 min en hielo.
9. Añadir 150  $\mu$ l de Solución III fría y mezclar enérgicamente a través de movimientos de inversión.
10. Dejar 10 min en hielo, periodo en el cual la mayoría de las proteínas y DNA cromosómico precipitan.
11. Centrifugar durante 10 min a temperatura ambiente en centrifuga Eppendorff a máxima velocidad (12000 rpm).
12. Recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorff, evitando en lo posible de no arrastrar algo del sedimento; de lo contrario, podría inhibir en el futuro alguna enzima de restricción durante las digestiones.
13. Añadir 82  $\mu$ l de solución STEP, e incubar entre 50–60°C (en baño J.P.Selecta) durante 1h.
14. Agregar 532  $\mu$ l de solución fenol - cloroformo (1:1 v/v) y mezclar enérgicamente hasta la obtención de una emulsión homogénea.
15. Centrifugar durante 5 min.
16. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorff y repetir los pasos 14 y 15, si es posible hasta por dos veces.

17. Recuperar sobrenadante en nuevo tubo Eppendorff y añadir 532  $\mu$ l de cloroformo / isoamílico (24:1 v/v). De esta manera quedarán eliminados los restos de fenol cloroformo, los cuales podrían mas adelante inhibir alguna enzima de restricción.
18. Centrifugar durante 5 min y recuperar fase acuosa en nuevo tubo Eppendorff.
19. Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto frío (aproximadamente 1 ml), agitar por inversión y dejar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 h, caso contrario a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 20-30 min.
20. Centrifugar 10 min en frío, en una centrífuga Eppendorff a 12000 rpm.
21. Eliminar el sobrenadante por decantación o con la ayuda de una bomba de succión, quedando un sedimento de color blanquecino.
22. Lavar el sedimento mediante la adición de 1 ml de etanol frío al 70% y con ligeros golpes en la bases de los tubos Eppendorff desprender el sedimento.
23. Centrifugar en frío ( $4^{\circ}$ ) durante 10 min en una centrífuga Eppendorff a 12000 rpm.
24. Eliminar el sobrenadante y secar el sedimento en Speed Vac (Savant/DNA-Speed Vac/DNA110)
25. Adicionar 20  $\mu$ l de RNAasa diluida al sedimento, dando pequeños golpes para el desprendimiento de este y evitando que queden restos en las paredes del tubo.
26. Incubar durante 45 min a  $37^{\circ}\text{C}$  y se observará transparente y viscoso el DNA plasmídico.
27. Analizar la concentración y calidad del DNA, mediante el cargado de 1  $\mu$ l de muestra + 9  $\mu$ l de solución de corrido diluida en gel de agarosa al 0.7%.
28. Guardar el DNA extraído hasta su utilización a  $4^{\circ}\text{C}$ , o de lo contrario conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Protocolo de Lisis Alcalina para *Escherichia coli* (Método Birnboin y Doly, 1979)**

1. Efectuar un cultivo de noche de *E. coli* en cinco ml de medio TB, suplementado con los antibióticos, de acuerdo a las características genotípicas de la cepa.
2. En tubo Eppendorff adicionar 1,5 ml del cultivo de noche y centrifugar durante 1 min en una centrífuga Eppendorff a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante mediante bomba de aspiración y volver a carga el tubo Eppendorff con 1.5 ml del cultivo de noche, a fin de garantizar un buen volumen de células, volviendo a repetir la succión con bomba.
3. Resuspender el sedimento en 100  $\mu$ l de Solución I fría, empleando el vórtex (dando un aspecto lechoso) .
4. Adicionar 200  $\mu$ l de Solución II (la cual está a temperatura ambiente) y mezclar por inversión hasta obtener una solución viscosa pero transparente.
5. Dejar reposar 10 min en hielo.

6. Añadir 150  $\mu$ l de Solución III fría y mezclar energicamente a través de movimientos de inversión (resultando la formación de grumos).
7. Dejar 10 min en hielo, periodo en el cual la mayoría de las proteínas y DNA cromosómico precipitan.
8. Centrifugar durante 10 min a temperatura ambiente, en centrifuga Eppendorff a máxima velocidad (12000 rpm).
9. Recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorff, evitando en lo posible de no arrastrar algo del sedimento, de lo contrario podría inhibir en el futuro alguna enzima de restricción durante las digestiones.
10. Agregar 450  $\mu$ l de solución fenol / cloroformo (1:1 v/v) y mezclar energicamente hasta la obtención de una emulsión homogénea.
11. Centrifugar durante 5 min.
12. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorff y repetir los pasos 10 y 11. Si es posible hasta por dos veces.
13. Recuperar el sobrenadante en nuevo tubo Eppendorff y añadir 532  $\mu$ l de cloroformo / isoamílico (24:1 v/v). De esta manera quedarán eliminados los restos de fenol cloroformo, los cuales podrían mas adelante inhibir alguna enzima de restricción.
14. Centrifugar durante 5 m y recuperar fase acuosa en nuevo tubo Eppendorff.
15. Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto frío (aproximadamente 1 ml), agitar por inversión y dejar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 60 min o caso contrario a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 20-30 min.
16. Centrifugar 10 min en frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ), en una centrífuga Eppendorff a 12000 rpm.
17. Eliminar el sobrenadante por decantación o con la ayuda de una bomba de succión, quedando un sedimento de color blanquecino
18. Lavar el sedimento mediante la adición de 1 ml de etanol frío al 70% y con ligeros golpes en la bases de los tubos Eppendorff desprender el sedimento.
19. Centrifugar en frío durante 10 min, en una centrífuga Eppendorff a 12000 rpm.
20. Eliminar el sobrenadante y secar el sedimento en Speed Vac (Savant/DNA-Speed Vac/DNA110).
21. Adicionar 20  $\mu$ l de RNAasa diluida al sedimento, dando pequeños golpes para el desprendimiento de éste y evitando que queden restos en las paredes del tubo.
22. Incubar durante 45 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , al término del cual se observará transparente y viscoso el DNA plasmídico
23. Analizar la concentración y calidad del DNA, mediante el cargado de 1  $\mu$ l de muestra + 9  $\mu$ l de solución de corrido diluida en gel de agarosa al 0.7%.
24. Almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$  el DNA extraído hasta su utilización, o de lo contrario conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.- PURIFICACIÓN DE DNA CROMOSÓMICO

La mayoría de protocolos descritos para la extracción de DNA cromosómico a partir de células bacterianas consisten en una lisis con detergentes y lisozima, seguida de una incubación en presencia de una proteasa inespecífica (proteínasa K) y una serie sucesiva de extracciones con fenol-cloroforno y alcohol isoamílico. Pero en ocasiones, estos tratamientos son insuficientes para extraer los numerosos exopolisacáridos que presentan algunas bacterias, los cuales interfieren en la actividad de algunas enzimas utilizadas en biología Molecular (Maniatis, *et al.* 1982). Por ello, se siguió un procedimiento que emplea un compuesto como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), capaz de acomplejarse con estos polisacáridos y proteínas residuales, del que se obtiene un DNA cromosómico fácilmente digerible.

**Protocolo de Lisis Alcalina para *S. enterica* Typhimurium.**- Se trata de una técnica muy similar a las empleadas anteriormente

1. Efectuar un cultivo de noche de *S. enterica* Typhimurium en 5 ml de medio LB, suplementado con los antibióticos de acuerdo a las características genotípicas de la cepa.
2. En tubo Eppendorff adicionar 1,5 ml del cultivo de noche y centrifugar (Hettich-Zentrifugen / Mikro 12-24) durante 1 min en una centrifuga Eppendorff a temperatura ambiente.
3. Eliminar el sobrenadante mediante bomba de aspiración y volver a carga el Eppendorff con 1,5 ml del cultivo de noche a fin de garantizar un buen volumen de células
4. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 min y succionar el sobrenadante con bomba de aspiración.
5. Resuspender en vórtex, el sedimento en 567  $\mu$ l en H<sub>2</sub>O (MQ).
6. Adicionar 3  $\mu$ l de proteinquinasa K (20 mg/ml).
7. Añadir 30  $\mu$ l de SDS 10% y agitar por inversión.
8. Dejar a 37°C durante 1 h en baño María.
9. Adicionar 100  $\mu$ l de NaCl 5M y agitar vigorosamente.
10. Adicionar 80  $\mu$ l de solución CTAB/NaCl.
11. Mezclar e incubar durante 10 min a 65°C.

12. Añadir 750  $\mu$ l de cloroformo-isomamílico y centrifugar durante 5 min.
13. Recuperar la fase acuosa, empleando puntas de micropipeta recortadas con el objeto de que tengan mayor diámetro y poder retirar.
14. Limpiar el DNA con fenol-cloroformo. Repetir esta operación hasta eliminar completamente la interfase blanca.
15. Adicionar 750  $\mu$ l de cloroformo isoamílico, agitando vigorosamente.
16. Centrifugar y retirar la fase acuosa.
17. Precipitar el DNA añadiendo 0,6 volúmenes (450 $\mu$ l) de isopropanol absoluto.
18. Agitar suavemente, apareciendo filamentos de DNA cromosómico.
19. Centrifugar durante 10 min.
20. Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento en 1 ml de etanol al 70%

**Nota:** Como modo alternativo a este procedimiento, también se empleó el Kit de Extracción de DNA Plasmídico “Wizard Mipreps” (Promega).

### Soluciones y Tampones

#### □ **Solución de Proteinasa K (20 mg/ml).**

A.- Empleo: Durante la extracción de DNA plasmídico (*S. enterica* Typhimurium)

B.- Componentes:

B.1.- Proteinasa K (Roche Diagnostics).	20 mg
B.2.- H <sub>2</sub> O (MQ).	1 ml

C.- Preparación:

- C.1.- Adicionar cada uno de los componentes en el orden señalado.
- C.2.- Agitar hasta su completa disolución.
- C.3.- Alicuotar 50  $\mu$ l en viales y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### □ **Solución de Lisozima (10 mg/ml).**

A.- Empleo: En digestión de paredes celulares durante purificación de DNA.

B.- Componentes:

B.1.- Lisozima.	10 mg
B.2.- Solución I	1 ml

C.- Preparación:

- C.1.- Diluir completamente la lisozima en la solución I. Esta debe conservarse a  $4^{\circ}\text{C}$  y prepararse momentos antes de su utilización.

□ **Solución I (Stock 2X)**

A.- Empleo: Durante proceso de purificación de DNA.

B.- Componentes:

B.1.- Tris HCl (Sigma), pH = 8	50 ml
B.2.- EDTA (Amresco), 0,5 M, pH = 8	40 ml
B.3.- H <sub>2</sub> O MQ.	910 ml

C.- Preparación:

- C.1.- En la obtención de la Solución I se mezcla 50 ml de Solución I (2X) con 50 ml de H<sub>2</sub>O MQ
- C.2.- Almacenar a 4°C.

□ **Solución II**

A.- Empleo: En lisis alcalina durante proceso de purificación de DNA.

B.- Componentes:

B.1.- H <sub>2</sub> O (MQ).	44 ml
B.2.- SDS (Merck) al 10%.	5 ml
B.3.- NaOH 10N.	1 ml

C.- Preparación:

- C.1.- Adicionar cada uno de los componentes en el orden señalado.
- C.2.- Almacenar a temperatura ambiente.

□ **Solución III**

A.- Empleo: Para neutralizar el pH alcalina generado por la solución II, durante proceso de purificación de DNA.

B.- Componentes:

B.1.- Acetato potásico 5M (Merck).	600 ml
B.2.- Ácido Acético Glacial (Panreac).	11,5 ml
B.3.- H <sub>2</sub> O MQ.	285 ml

C.- Preparación:

- C.1.- Adicionar cada uno de los componentes en el orden señalado.
- C.2.- Almacenar a 4°C.

□ **EDTA 0,5 M, pH = 8**

A.- Empleo: Componente de Solución I, durante proceso de purificación de DNA.

B.- Componentes:

B.1.- EDTA (Merck).	146,12 g
B.2.- H <sub>2</sub> O destilada.	aforar a 1 l

C.- Preparación:

- C.1.- Verter el agua hasta completar 1 l y equilibrar el pH = 8 añadiendo NaOH 10 N.
- C.2.- Almacenar a temperatura ambiente.

### □ **Solución de Fenol**

A.- Empleo: En preparación de solución Fenol – Cloroformo.

B.- Componentes:

B.1.- Fenol (Aldrich). 2 kg

C.- Preparación:

- C.1.- El fenol redestilado se licua en un baño regulado a 68-70°C y se le añade hidroxiquinoleina (Panreac) hasta una concentración final al 0,1% (p/v).
- C.2.- Adicionar igual volumen de solución Tris HCl 0,5 M (pH = 8), mezclando con ayuda de una barra magnética por un periodo de 15 min.
- C.2.- Dejar reposar por varias horas, hasta separar la fase acuosa (fase superior transparente) y la fase orgánica (fase inferior amarilla).
- C.3.- Retirar la fase acuosa por aspiración, tanto como sea posible y tantas veces como fuese necesario, hasta que el fenol alcance un pH > 7,8, pero utilizando para la segunda y posteriores veces Tris HCl 0,1 M (pH = 8) .
- C.4.- Conservar en refrigeración (4°C) en botella oscura durante un mes y debe manipularse con guantes y dentro de cabinas de aspiración de aire.

### □ **Solución de Fenol - Cloroformo**

A.- Empleo: Desproteínizado durante proceso de purificación de DNA.

B.- Componentes:

B.1.- Fenol (Aldrich) (stock que se halla a 4°C). 250 ml  
B.2.- Cloroformo Isoamílico (24:1). 250 ml

C.- Preparación:

- C.1.- Añadir en primer lugar el fenol, aspirar el sobrenadante y luego añadir el cloroformo isoamílico.
- C.2.- Incubar a 37°C durante toda la noche hasta la aparición de dos fases, y aspirar la fase transparente dejando solo 1 cm de espesor.

### □ **Solución de Cloroformo / Isoamílico 24:1**

A.- Empleo: Eliminación de restos de fenol-cloroformo, durante purificación de DNA.

B.- Componentes:

B.1.- Cloroformo (Carlo-Erba). 480 ml  
B.2.- Etanol Isoamílico (Panreac). 20 ml

C.- Preparación:

- C.1.- Disolver el etanol en el volumen de cloroformo señalado.
- C.2.- Mantener a temperatura ambiente.

□ ***Etanol 70%***

A.- Empleo: En la precipitación del DNA durante su purificación.

B.- Componentes:

B.1.- Etanol absoluto (Carlo Erba).	70 ml
B.2.- H <sub>2</sub> O MQ.	30 ml

C.- Preparación:

C.1.- Adicionar cada uno de los componentes en el orden señalado.

□ ***Acetato Sódico, 3M***

A.- Empleo: Optimizar el proceso de precipitación de DNA, durante su purificación.

B.- Componentes:

B.1.- H <sub>2</sub> O (MQ).	Aforar hasta 100 ml
B.2.- Acetato sódico (Merck).	24,60 g

C.- Preparación:

C.1.- Adicionar cada uno de los componentes en el orden señalado, hasta completa disolución.

□ ***Solución Stock de RNAasa***

A.- Empleo: Como solución stock de RNAasa.

B.- Componentes:

B.1.- Solución Stock:	
B.1.1.- RNAasa (4°C).	10 mg
B.1.2.- Tris HCl 1M, pH 7,5	10 µl
B.1.3.- NaCl 5M.	03 µl
B.1.4.- H <sub>2</sub> O (MQ).	987 ml

C.- Preparación:

C.1.- Adicionar cada uno de los componentes en el orden señalado.

C.2.- Distribuir en viales con 25 µl y almacenar a 4°C.

□ ***Solución de RNAasa diluida***

A.- Empleo: En la digestión de restos de RNA presentes en purificaciones de DNA.

B.- Componentes:

B.1.- RNAasa (4°C) de solución concentrada.	25 µl
B.2.- Tampón TE.	500 µl

C.- Preparación:

C.1.- Adicionar cada uno de los componentes hasta su completa disolución.

C.2.- Almacenar a 4°C.

### □ **Buffer TE, pH : 7,5**

A.- Empleo: Resuspender el DNA, durante proceso de purificación del DNA.

B.- Componentes:

B.1.- EDTA (Merck) 0,5 M, pH = 8	2 ml
B.2.- Tris HCl (Sigma), 1M, pH = 7,5	1 ml
B.3.- H <sub>2</sub> O (MQ).	97 ml

C.- Preparación:

- C.1.- Adicionar el agua y posteriormente el EDTA con el tris HCl.
- C.2.- Autoclavar.

### □ **SDS 10%**

A.- Empleo: Solución detergente, en preparación de Solución II, durante purificación del DNA.

B.- Componentes:

B.1.- SDS (Merck).	100 g
B.2.- H <sub>2</sub> O (MQ).	900 ml

C.- Preparación:

- C.1.- Disolver la sal en agua a 68°C aproximadamente.
- C.2.- Ajustar a pH = 7 con HCl concentrado y aforar hasta un volumen final de 1 l.

### □ **Solución STEP**

A.- Empleo: Durante extracción de DNA plasmídico.

B.- Componentes:

B.1.- SDS 10%.	50 µl
B.2.- Tris HCl 1M, pH 7,5	50 µl
B.3.- EDTA 0,5 M.	800 µl
B.4.- H <sub>2</sub> O (MQ).	100 µl
B.5.- PK, Vial de stock concentrada (20 µg/ml).	50 µl

C.- Preparación:

- C.1.- Preparación en el momento de extracción.

### □ **Solución de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) / NaCl**

A.- Empleo: Promover la lisis celular, durante el proceso de purificación de DNA cromosómico.

B.- Componentes:

B.1.- NaCl (Panreac).	4,1 g
B.2.- H <sub>2</sub> O (MQ)	80 ml.
B.3.- CTAB (Sigma).	10 g.

### C.- Preparación:

- C.1.- Disolver el NaCl en el volumen de agua señalado, en un vaso de precipitación y con barra magnética.
- C.2.- Calentar hasta 68°C e ir adicionando lentamente el CTAB, hasta obtener su disolución.
- C.3.- Conservar por encima de los 15°C, para evitar la precipitación del CTAB.

### 4.3.- ELECTROFORESIS DE DNA

Esta técnica de separación se sustenta en el movimiento o migración de esta biomolécula a través de una matriz o soporte reticulado de agarosa como resultado de una campo eléctrico. La movilidad electroforética depende de la longitud, la topología de las moléculas de DNA, porosidad del soporte (agarosa) y corriente aplicada (Maniatis, *et al.* 1982; Perera, *et al.* 2002a).

En este trabajo se han empleado geles horizontales de dos tamaños diferentes.

- Minigeles: 10,2 X 6,5 cm para un volumen de 30 ml de agarosa licuada.
- Geles Medianos: 15 X 10,7 cm para un volumen de 100 ml de agarosa licuada

La elección de uno u otro fue en función del experimento concreto a realizar. Así, para el análisis de la calidad y cantidad de DNA y para la comprobación de digestiones se emplearon minigeles, mientras que los geles medianos se utilizan en electroforesis preparativas. La ventaja de los primeros es de tipo económico, tanto por el volumen de gel a emplear y el volumen de muestra requerido, como por el tiempo de electroforesis.

### Protocolo

#### 1. Preparación de:

- *Bandeja de Electroforesis.*- La construcción del gel de agarosa se efectúa en una bandeja, cuyos frontales han sido cerrados transitoriamente con cinta adhesiva y en el que se ha insertado una pieza dentada (peine) para la formación de los pocillos.

- *Preparación de Muestras para Electroforesis.*- Regularmente fueron preparados 10  $\mu$ l de suspensión conteniendo la muestra. La cual esta compuesta por un medio de aplicación que lleva un tampón (solución TE), un componente de gran densidad (sacarosa, glicerol, ficoll, etc.) que facilita su aplicación y evita que la disolución de la misma difunda rápidamente, y uno o mas compuestos coloreados (azul de bromofenol, xilencianol, etc.) que actúan de marcadores y que permite seguir con facilidad la marcha del desarrollo del gel. Durante procesos de recuperación de bandas de agarosa, conteniendo fragmentos de DNA deseado; fue preciso preparar volúmenes mayores, por encima de los 100  $\mu$ l.
2. Pesar la cantidad adecuada de agarosa en polvo y añadir el correspondiente volumen de tampón de electroforesis (TAE 1X).
  3. En horno microondas, calentar hasta fundir la agarosa, evitando que queden partículas en suspensión.
  4. Atemperar la disolución hasta 50-55°C y añadir la solución de bromuro de etidio a una concentración final de 0,5  $\mu$ g/ml, a partir de la solución stock de 10 mg/ml (5  $\mu$ l por cada 100 ml de agarosa licuada); esta debe efectuarse a una temperatura aproximada de 35°C.
  5. La disolución de agarosa se vierte en la bandeja y se deja enfriar hasta su solidificación, tras lo que el cierre de los frontales y el peine se retiran. El tamaño de los pocillos puede variar mediante el uso de peines de distintas dimensiones.
  6. En la cubeta, el gel se coloca en posición horizontal y se cubre totalmente (gel sumergido) con la disolución tampón (lo que ayuda a la disipación del calor)
  7. La(s) muestra(s) de DNA, con ayuda de micropipetas son introducidas en cada uno de los pocillos formados por el peine. Generalmente en uno o más pocillos se añade una mezcla de fragmentos lineales de DNA de tamaño conocido ( $\lambda$   $\perp$  BstE II y/o  $\lambda$   $\perp$  Hind III), que permite, una vez finalizada la electroforesis, poder establecer relaciones con las bandas de la muestra de DNA y deducir el tamaño aproximado de las mismas.
  8. Cerrar la bandeja y conectar los electrodos, aplicando un voltaje constante (entre 20 y 80 V, dependiendo del tipo de gel), empleando una fuente de poder Bio – Rad (Mod. 200/2.0 Power suplí).
  9. Transcurrido el tiempo estimado, se verifica la migración de las moléculas por medio de un transiluminador UV, y si es preciso se efectúa un revelado fotográfico (Revelador Mitsubishi – Video Copy Processor).

### Soluciones y Tampones

#### □ **Solución Tris Acetato (TAE, X50)**

A.- Empleo: En la preparación del gel de agarosa y como medio de suspensión de la matriz de agarosa durante electroforesis.

B.- Componentes:

B.1.- Tris Base.	242 g
B.2.- Ácido Acético Glacial.	57,1 ml
B.3.- EDTA, 0,5 M, pH = 8	0,5 M

C.- Preparación:

C.1.- Adicionar cada uno de los componentes hasta obtener un pH = 8.

□ **Solución Transportadora Concentrada de Corrido Electroforético**

A.- Empleo: Como solución stock para corrido electroforético.

B.- Componentes:

B.1.- Sacarosa.	40% (p/v)
B.2.- EDTA.	50 mM
B.3.- Tris	20 mM
B.4.- Azul de Bromofenol	0,25% (p/v)

C.- Preparación:

C.1.- Adicionar cada uno de los componentes en el orden señalado.

□ **Solución Transportadora Diluida de Corrido Electroforético**

A.- Empleo: Como solución vehículo, de muestra de DNA para corrido electroforético.

B.- Componentes:

B.1.- Solución concentrada de corrido.	200 $\mu$ l
B.2.- H <sub>2</sub> O (MQ).	1000 $\mu$ l

C.- Preparación:

C.1.- Diluir la solución concentrada en el volumen señalado.  
C.2.- Almacenar a 4°C.

□ **Solución de Bromuro de Etidio (10 mg/ml)**

A.- Empleo: Como agente intercalante y revelador de DNA durante corridos electroforéticos.

B.- Componentes:

B.1.- Bromuro de Etidio.	10 mg
B.2.- H <sub>2</sub> O (MQ).	990 $\mu$ l

C.- Preparación:

C.1.- Adicionar el agua al bromuro de etidio hasta su completa disolución.  
C.2.- Guardar en botella oscura y a 4°C

□ **Preparación de Marcador de Peso Molecular  $\lambda$   $\perp$  Hind III**

A.- Empleo: Como marcador de masa molecular durante corrido electroforético, presentando el siguiente patrón de bandedo(en kb)

23,13 / 09,41 / 06,55 / 04,36 / 02,32 / 02,02 / 00,56 / 00,12

B.- Componentes (para un volumen final de 500  $\mu$ l):

B.1.- H <sub>2</sub> O (MQ).	266 $\mu$ l
------------------------------	-------------

B.1.- Tampón B.	50 µl
B.2.- Lambda (Roche) (vial almacenado a -20°C).	180 µl
B.3.- <i>Hind</i> III (Roche).	4 µl

C.- Preparación:

- C.1.- Adicionar cada uno de los componentes en el orden señalado.
- C.2.- Incubar a 37°C durante toda la noche.
- C.3.- Cargar 1 µl en gel de agarosa 0,7 %, para comprobar digestión y establecer el bandeo adecuado.
- C.4.- Almacenar a 4°C y transportarla en hielo durante su utilización.

□ **Preparación de Marcador de Peso Molecular  $\lambda$   $\perp$  *Bst* E II**

A.- Empleo: Como marcador de masa molecular durante corrido electroforético, presentando el siguiente patrón de bandeo (en kb).

14,14 / 08,45 / 07,24 / 06,36 / 05,68 / 04,82 / 04,32 / 02,67 /  
/ 02,32 / 01,92 / 01,37 / 01,26 / 00,70 / 00,22 / 00,11

B.- Componentes (para un volumen final de 400 µl):

B.1.- H <sub>2</sub> O (MQ).	266 µl
B.2.- Tampón B (Roche).	50 µl
B.3.- Lambda ( $\lambda$ ) (Roche) (vial almacenado a -20°C).	180 µl
B.4.- <i>Bst</i> EII (Roche).	4 µl

C.- Preparación:

- C.1.- Adicionar cada uno de los componentes en el orden señalado.
- C.2.- Incubar a 60°C durante toda la noche.
- C.3.- Cargar 1 µl en gel de agarosa 0,7 % para comprobación de digestión y establecer el bandeo adecuado.
- C.4.- Almacenar a 4°C y transportarla en hielo durante su utilización.

### 4.4.- DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción son también conocidas como endonucleasas de restricción y cortan el enlace fosfodiéster de la doble hebra de DNA y tienen múltiples aplicaciones (mapas de restricción, fragmentación de DNA genómico para Southern Blot, Northern Blotting, generación de fragmentos para ser clonados, etc.). Para estos objetivos normalmente se utilizan las enzimas de tipo II, que reconocen una secuencia palindrómica de 4–6 pb, cortando las dos hebras de DNA en la secuencia de reconocimiento o cerca de ella.

Son varios los factores que influyen en la reacción de este tipo de enzimas, como: pureza de DNA, temperatura, pH, presencia de DNAasa, DNA contaminado

con otro DNA, grado de metilación, tipos de moléculas de DNA, tampón adecuado, etc. (Maniatis, *et al.* 1982).

En el caso de que el DNA deba ser digerido con más de una enzima de restricción, las dos digestiones pueden hacerse simultáneamente, si ambas pueden actuar con el mismo tampón (con mayor o menor eficiencia). Si el tampón no es compatible con las enzimas de restricción, se realiza primero la digestión con el enzima cuyo requerimiento salino es menor y se corrige posteriormente la concentración salina para la segunda digestión.

### Protocolo (para un Volumen final de 20 $\mu$ l)

1. Preparación de la digestión: La cual dependerá de la concentración de DNA recuperado.

<input type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O (MQ).	16 $\mu$ l	13 $\mu$ l
<input type="checkbox"/> Buffer (de acuerdo al tipo de Enzima).	02 $\mu$ l	02 $\mu$ l
<input type="checkbox"/> DNA (muestra).	02 $\mu$ l	05 $\mu$ l
<input type="checkbox"/> Enzima de Restricción	0,3 $\mu$ l	0,3 $\mu$ l

Pueden ser digestiones de 2-3 h, o toda una noche, además de tener en cuenta la temperatura de digestión.

2. Pasado el tiempo de digestión, adicionar 2  $\mu$ l de solución transportadora concentrada. Para la preparación de los controles, se prepara 1 $\mu$ l de muestra control de DNA + 9  $\mu$ l de solución transportadora diluida.
3. Cargar en gel de agarosa al 0,7%, para electroforesis.

### 4.5.- AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Esta es una técnica muy útil en biología molecular, ya que permite amplificar desde más de un millón de veces, en 20-30 ciclos una sola copia de DNA. Esta amplificación permite el análisis de la secuencia por visualización en geles de agarosa o secuenciación.

Esta técnica requiere el empleo de cebadores complementarios a las cadenas opuestas de DNA y que estén orientados, con lo cual la extensión del cebador procede de el extremo 5' hasta el 3', desde cada uno de los cebadores

hacia el otro. Como consecuencia de esta configuración, el DNA sintetizado contiene un punto de unión para el cebador opuesto en su extremo 3'. Estos productos de extensión de los cebadores sirven de molde para la próxima vuelta de replicación y ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación y polimerización, produciéndose de manera exponencial copias del segmento de DNA comprendido entre los dos cebadores (Perera, *et al.* 2002a).

#### 4.5.1.- Cebadores Empleados

CEBADORES (Roche)	N° DE BASES	SECUENCIA	POSICIÓN	APLICACION
UvrB up RV	19	5' - <b>gat atc</b> GCG TCT ACG CCT C - 3'	+ 552	En amplificación de banda de PCR, con diana <i>Eco</i> RV generadas de forma artificial, y que incluye el gen <i>uvrB</i>
UvrB rv <i>Eco</i> RV	21	5' - <b>gat atc</b> CGA TGA CTC GCT GGC - 3'	- 2049	En amplificación de banda de PCR, con diana <i>Eco</i> RV generadas de forma artificial, y que incluye el gen <i>uvrB</i>
MoaAE up <i>Eco</i> RV	21	5' - <b>gat atc</b> GAC CGG CTA AAA GAC - 3'	+ 330	En amplificación de banda de PCR, con diana <i>Eco</i> RV generadas de forma artificial, y que incluye el operon <i>moa</i>
MoaAE rv <i>Eco</i> RV	20	5' - <b>gat atc</b> CGT CAC CAC AAA CG - 3'	- 3111	En amplificación de banda de PCR, con diana <i>Eco</i> RV generadas de forma artificial, y que incluye al operon <i>moa</i>
MoaAE up <i>Hind</i> III	21	5' - <b>aag ctt</b> GAC CGG CTA AAA GAC - 3'	+ 330	En amplificación de banda de PCR, con diana <i>Hind</i> III generadas de forma artificial, y que incluye el operon <i>moa</i>
MoaAE rv <i>Hind</i> III	20	5' - <b>aag ctt</b> CGT CAC CAC AAA CG - 3'	- 3111	En amplificación de banda de PCR, con diana <i>Hind</i> III generadas de forma artificial, y que incluye al operon <i>moa</i>
up universal para secuenciación	24	5' - CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3''		Durante secuenciación de fragmentos conteniendo gen <i>uvrB</i> u operon <i>moa</i>
rv universal para secuenciación	17	5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3''		Durante secuenciación de fragmentos conteniendo gen <i>uvrB</i> u operon <i>moa</i>
up universal para PCR de comprobación	24	5' - CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'		Durante amplificaciones de bandas conteniendo gen <i>uvrB</i> u operon <i>moa</i> en vectores de clonación
rv universal para PCR de comprobación	19	5' - GAA AAC AGC TAT GAC CAT G - 3''		Durante amplificaciones de bandas conteniendo genes <i>uvrB</i> u operon <i>moa</i> en vectores de clonación

### Protocolo

1. Preparación de la Cámara de PCR.
  - Dejar irradiar en cámara de flujo, el siguiente material: pipetas, puntas de micropipetas (de diferentes volúmenes), gradilla conteniendo tubos Eppendorff, sobre una base de hielo y otros, durante 15 m.
  - Preparación de la Mezcla.- La cual esta preparada para un volumen final de 25µl :
 

▪ Buffer				2,5 µl
▪ DNTPs				2,5 µl
▪ Primer up (directo)(10 pmol/µl)				1,25 µl
▪ Primer rev (reverso)(10 pmol/µl)				1,25 µl
▪ Taq polimerasa				0,2 µl
▪ H <sub>2</sub> O (MQ)			Hasta un volumen final de 25µl	
▪ DNA :	Plásmido	=	50-100 µg	→ 0,2 – 0,5µl
	Cromosómico	=	100-200 µg	→ 0,3 µl
2. Regularmente se procede a preparar 75 µl sin la adición de DNA, de las cuales se distribuye 25 µl en cada tubo Eppendorff :
  - 25 µl para el control negativo (sin DNA)
  - 25 µl para el control positivo
  - 25 µl para el DNA problema.
3. Programación de termociclador (Eppendorff / Mastercycler Personal).- Según características de banda a amplificar.
4. Cargar muestras en gel de agarosa al 0,7%, y observar resultados.

### Condiciones de Amplificación

#### □ Programa de PCR

#### Cebadores:

- moaA-E up *Eco* RV / moaA-E rv *Eco* RV
- moaA-E up *Hind* III / moaA-E rv *Hind* III

CNTRL	WAIT	AUTO	BLOCK
LID = 105°			
1.- T = 95°			0 : 05 : 00
2.- T = 95°			0 : 01 : 00
3.- T = 63°			0 : 01 : 00
4.- T = 68°			0 : 03 : 30
5.- GOTO 2 REP 30			
6.- T = 68°			0 : 07 : 00
7.- LINK 4 IND			
8.- end			

□ **Programa de PCR**

**Cebadores :**

- uvrB up *Eco* RV / uvrB rv *Eco* RV

	CNTRL LID = 105°	BLOCK
	WAIT	AUTO
1.-	T = 95°	0 : 05 : 00
2.-	T = 95°	0 : 01 : 00
3.-	T = 65°	0 : 01 : 00
4.-	T = 72°	0 : 03 : 30
5.-	GOTO 2 REP 30	
6.-	T = 72°	0 : 07 : 00
7.-	LINK 4 IND	
8.-	end	

□ **Mezcla de dNTPs, para PCR**

A.- Empleo: Como componente de la mezcla de reacción para PCR.

B.- Componentes:

B.1.- H <sub>2</sub> O (MQ).	460 µl
B.2.- dATP	10 µl
B.3.- dGTP	10 µl
B.4.- dTTP	10 µl
B.5.- dCTP	10 µl

C.- Preparación:

- C.1.- Alicuotar en 10 viales, conteniendo 50 µl en cada uno y almacenar a -20°C hasta su utilización, la cual debe siempre manipularse en hielo.

**4.6.- LIGACIÓN DE DNA**

Este tipo de procedimiento tiene por objeto el lograr moléculas recombinantes de DNA. Los productos de PCR recuperados presentan la característica de presentar terminales con adeninas, las cuales son aprovechadas para el empleo del vector de clonación pGEM<sup>®</sup>-T (vector de Promega), el cual está linealizado y con terminales de timina, facilitando la ligación de las moléculas obtenidas por PCR.

### Protocolo (Según Promega)

1. Tampón de DNA ligasa del T4 (10X). 0,5 µl
2. DNA del Vector pGEM<sup>®</sup>-T (vector de Promega). 0,5 µl
3. Banda de PCR a ligar. 3 M
4. H<sub>2</sub>O (MQ) hasta completar 5 µl de volumen final.

Para poder ligar los productos de PCR al vector pGEM<sup>®</sup>-T se utilizó una relación 3:1 (inserto : vector). Para calcular la cantidad de inserto y de vector en la reacción de ligación se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{ng de inserto} = \left\{ \frac{(\text{ng de vector}) (\text{tamaño en Kb de inserto})}{(\text{tamaño de vector en kb})} \right\} (\text{Relación Molar Inserto : Vector})$$

El periodo de reacción es de 2 h a 4°C cuando se trata de extremos cohesivos. Antes de transformar células competentes, la ligación se incuban a 70°C durante 10 min y posterior paso a 4°C durante 3 min.

Además, en este trabajo también ha sido necesario la ligación de otros fragmentos de DNA, utilizando el siguiente procedimiento

1. Tampón de DNA ligasa de T4 (10X). 1 µl
2. DNA del vector. 1M
3. DNA ligasa de T4. 1 µl
4. Banda de DNA a ligar. 3 M
5. H<sub>2</sub>O (MQ). hasta completar 10 µl
6. En este caso, la incubación es a 25°C toda la noche (extremos romos) o 2 h a 4°C (extremos cohesivos). Antes de transformar, se inactiva la ligación incubándola a 70°C durante 10 min y dejando posteriormente a 4°C por 3 min.

### 4.7.- RECUPERACIÓN Y PROCESAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA

La electroforesis no sólo es un método analítico, sino también preparativo para aislar fragmentos puros de DNA. Tras el desarrollo y visualización de la electroforesis, puede recortarse la pieza de gel donde se localiza una banda particular y, a partir de ella, aislar las moléculas allí presentes, lo que permite disponer de un método práctico para separar una molécula o fragmento a partir de una mezcla que pudiera ser muy compleja. En este trabajo, la extracción del

material incluido en la pieza de gel, se efectuó por fusión de la agarosa y extracción de la misma con solventes orgánicos.

Bert Vogelstein y David Gillespie, del National Center Institute de Bethesda, haciendo uso de ciertas propiedades que tienen las sales ecotrópicas como el perclorato o el ioduro potásico para disolver la agarosa, prepararon una disolución caliente de NaI, quedando perfectamente soluble el DNA y la agarosa. La etapa posterior es la unión del DNA a un sustrato de gran afinidad (tierra de diatomeas, silicagel), siendo por último precipitado el DNA con etanol (Perera, *et al.* 2002a).

### Protocolo

1. Efectuada la digestión con la(s) enzima(s) de restricción se procede al corrido electroforético. Si la banda a recuperar es muy pequeña la electroforesis se efectúa en un gel al 1,5%.
2. Visualizada la banda de nuestro interés en el gel de agarosa, es cortado el fragmento de agarosa en un transiluminador UV y depositada en un tubo Eppendorff, el cual previamente había sido tarado; la banda no debe exceder mas de 0,4 g, caso contrario se debe cortar y depositarlo en dos tubos Eppendorff.
3. Añadir 2,5 volúmenes de solución de NaI 6M (adicionar volumen adecuado, caso contrario se puede desnaturalizar el DNA), con respecto al peso de la banda. No exceder esta cantidad.
4. Incubar el tubo en baño de agua a 45–55°C durante 5 min, hasta que la agarosa quede completamente licuada. Paralelamente depositar un tubo Eppendorff con H<sub>2</sub>O (MQ) a esta misma temperatura.
5. Distribuir el volumen anterior en 2 tubos Eppendorff, conteniendo cada uno solo la mitad de la muestra, lo que es equivalente a 400-500 µl / tubo Eppendorff.
6. Añadir 800 µl de resina
  - Para bandas muy pequeñas (inferiores a 500 - 1000 pb): resina PCR, previa agitación
  - Para bandas grandes: tierra de diatomeas, previa agitación.
  - Ambas tienen el objeto de secuestrar al DNA.
7. Agitar por inversión el contenido de cada uno de los tubos Eppendorff y dejar reposar por 5 min.
8. Montar la columna de la siguiente manera:
  - Tubo de ensayo en gradilla
    - Colocar la columna conteniendo el filtro en boca de tubo de ensayo (las cuales deben estar estériles y asegurarse de que porten el filtro)
    - Insertar la punta del cilindro de la jeringa en orificio de la columna.
    - Verter el contenido de los tubo Eppendorff en el cilindro de la jeringa.

- Colocar el émbolo y ejerciendo presión sobre él, hasta lograr el paso completo del contenido a través de la columna.
9. Desmontar el émbolo y el cilindro de la jeringa, en este momento el DNA se halla retenido en la columna con la resina.
  10. Montar nuevamente el cilindro de la jeringa, al cual se le adiciona 3 ml de isopropanol al 80% (que es conservado a temperatura ambiente) y es colocado nuevamente el émbolo, al que se ejerce presión (se podrá apreciar que existirá bastante resistencia, aún así efectuar este procedimiento) con el objeto de lavar el DNA que sigue retenido en la columna.
  11. Desmontar el sistema, y la columna es centrifugada dentro de un tubo Eppendorff durante 5 min a máxima velocidad.
  12. Recuperar la columna y adicionar con pipeta, 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O caliente (MQ, que se encontraba a 55°C; podría adicionarse un mayor volumen, pero con el inconveniente de que el DNA a recuperar será más diluido).
  13. Centrifugar la columna en nuevo tubo Eppendorff por 5 min, recuperando un volumen algo menor a los 20  $\mu$ l adicionados anteriormente (el producto del centrifugado contiene el DNA).
  14. Cargar 1  $\mu$ l en gel de agarosa para apreciar concentración obtenida.

### Soluciones Empleadas

#### □ **Solución de Yoduro de Sodio 6M**

A.- Empleo: En la elución de DNA y agarosa, durante obtención de banda de agarosa conteniendo el DNA deseado.

B.- Componentes:

B.1.- NaI	8,93 gr
B.2.- H <sub>2</sub> O (MQ) hasta un volumen final de 10 ml.	7,50 ml

C.- Preparación:

- C.1.- Adicionar el agua al peso de NaI señalado.
- C.2.- Agitar y almacenar a 4°C.

#### □ **Solución de Isopropanol 80%**

A.- Empleo: En proceso de recuperación de banda de agarosa conteniendo DNA.

B.- Componentes:

B.1.- Isopropanol (= 2-propanol) (Panreac)	80 ml
B.2.- Agua (MQ)	20 ml

C.- Preparación:

- C.1.- Adicionar cada uno de los componentes en el orden señalado.

### □ **Tierra de Diatomeas**

A.- Empleo: Agente reclutante de DNA durante recuperación de DNA a partir de banda de agarosa.

B.- Componentes:

- |   |       |
|---|-------|
| B.1- Tierra de Diatomeas.                                       | 3 g.  |
| B.2.- H <sub>2</sub> O (MQ).                                    | 50 ml |
| B.3.- Solución de Guanidina 6M hasta resuspender completamente. |       |

C.- Preparación:

- C.1.- Disolver completamente la tierra de diatomeas en agua.
- C.2.- Dejar en reposo por un mínimo de 3 h, para la obtención del precipitado.
- C.3.- Retirar el sobrenadante por aspiración.
- C.4.- Añadir la solución de guanidina 6M, resuspendiendo completamente.
- C.5.- Almacenar a temperatura ambiente y en oscuridad.

### □ **Solución de Guanidina 6M**

A.- Empleo: En preparación de suspensión de tierra de diatomeas.

B.- Componentes:

- |   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| B.1.- Hidrocloruro de Guanidina (Sigma) | 100 g                               |
| B.2.- EDTA 0,5 M,                       | 14 ml (concentración final 20 mM)   |
| B.3.- Tris HCl 1M, pH = 7,5             | 8,75 ml (concentración final 50 mM) |
| B.4.- H <sub>2</sub> O (MQ)             | Aforar a 175 ml                     |

C. Preparación:

- C.1.- Diluir los componentes uno a uno en agua y luego aforar.

### **Protocolo de Digestión de DNA, Producto de Recuperación de Bandas**

Para un volumen final de 100 µl, debemos adicionar en tubo Eppendorff lo siguiente:

- |  |       |
|--|-------|
| 1. H <sub>2</sub> O (MQ).                                      | 69 µl |
| 2. Buffer de enzima de restricción.                            | 10 µl |
| 3. DNA (previamente recuperado).                               | 20 µl |
| 4. Enzima de Restricción.                                      | 1 µl  |
| 5. Incubar a la temperatura óptima de actividad de enzima.     |       |
| 6. Cargar de 3–5 µl en gel de agarosa para observar digestión. |       |

### **Obtención de Extremos Romos de Fragmentos de DNA**

La obtención de extremos romos se sustenta en el empleo de la DNA polimerasa del bacteriófago T4. Esta es una enzima monomérica de 114 kDa que presenta actividad polimerasa 5'→3', y requiere Mg<sup>2+</sup> como cofactor. También presenta actividad exonucleasa 3'→5', dependiente de Mg<sup>2+</sup>, siendo más activa sobre ssDNA que sobre dsDNA.

De otro lado, adolece de actividad exonucleasa 5'→3'. Esta enzima es funcionalmente análoga a la DNA polimerasa Klenow, aunque su actividad 5'→3' es más activa (unas 200 veces más activa que la del fragmento Klenow) (Perera, *et al.* 2002a).

### Protocolo

Para un volumen final de 100 µl, debemos adicionar en tubo Eppendorff lo siguiente:

- |  |       |
|--|-------|
| 1. DNA tratado con enzimas de restricción (toda la noche)  | 55 µl |
| 2. Buffer de DNA polimerasa T <sub>4</sub> (Roche) (o en todo caso el mismo tampón empleado durante la restricción). | 20 µl |
| 3. Mezcla de dNTPs.  | 20 µl |
| 4. DNA polimerasa de T <sub>4</sub> . (Roche).   | 5 µl  |
- Incubar a 37°C durante 15 min.
  - Inactivar la enzima de 70°C por 10 min.

### **Mezcla de dNTPs para obtener extremos romos**

A.- Empleo: Como componente de la mezcla de reacción durante la obtención de extremos romos de fragmentos de DNA.

B.- Componentes:

H <sub>2</sub> O (MQ).	492 µl
dATP (Roche).	02 µl
dGTP (Roche).	02 µl
dTTP (Roche).	02 µl
dCTP (Roche).	02 µl

C.- Preparación: Diluir los diferentes dNTPs en agua MQ, hasta un volumen final de 500 µl.

### **Defosforilación de Extremos Romos**

Esta se sustenta en el empleo de la fosfatasa alcalina de timo de ternera (calf intestine phosphatase, CIP), la cual es una proteína dimérica formada por dos subunidades idénticas de 69 kDa cada una. Esta actividad cataliza la eliminación de los restos fosfatos que esterifican grupos OH en posición 5' de NTPs, dNTPs y de moléculas de DNA y RNA, mono y bicatenarias (Perera, *et al.* 2002a).

Entre las aplicaciones que podemos darle a ésta enzima tenemos:

- 1.- Empleada en la eliminación de grupos fosfatos en 5'; para su sustitución de fosfatos marcados con  $^{32}\text{P}$  mediante reacción con quinasa.
- 2.- Eliminación de restos fosfatos de los terminales 5'; de fragmentos dsDNA para impedir su dimerización, polimerización o circularización.

### Protocolo

Para un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ , debemos adicionar en tubo Eppendorff lo siguiente:

- |  |                   |
|--|-------------------|
| 1. $\text{H}_2\text{O}$ (MQ).  | 80 $\mu\text{l}$  |
| 2. Buffer de fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) (que puede ser el buffer de la digestión). | 20 $\mu\text{l}$  |
| 3. Volumen de DNA.<br>(de la cual ya se han obtenido extremos romos).                            | 100 $\mu\text{l}$ |
| 4. Fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim (1u) (almacenada a 4°C).                              | 1 $\mu\text{l}$   |
| 5. Incubar a 37°C por 30 min.  |                   |
| 6. Fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) (1u).  | 1 $\mu\text{l}$   |
| 7. Incubar a 37°C por 30 min.  |                   |
| 8. Inactivar la enzima de 70°C por 10 m.   |                   |
| 9. Cargar en gel para recuperación de banda.   |                   |

### Precipitación de DNA

1. Los 100  $\mu\text{l}$  de digestión con la(s) enzima(s) de restricción (ya recuperada banda), son inactivadas a 70°C por 10 min.
2. El contenido es aforado a 400  $\mu\text{l}$  de agua MQ.
3. Adicionar 1 volumen de fenol-cloroformo y agitar vigorosamente.
4. Centrifugar a máxima velocidad por 5 min.
5. Recuperar el sobrenadante y adicionar un volumen de cloroformo – isoamílico, y agitar vigorosamente.
6. Centrifugar durante 5 min a máxima velocidad.

7. Recuperar el sobrenadante, adicionando 1 ml de etanol absoluto (4°C) y 40 µl de acetato de sodio 3M.
8. Almacenar en tubo Eppendorff a -80°C durante toda la noche.
9. Centrifugar a máxima velocidad durante 15 min a 4°C.
10. Descartar el sobrenadante y adicionar 1 ml de etanol al 70% (4°C), liberando el sedimento del fondo del tubo Eppendorff.
11. Centrifugar a máxima velocidad durante 15 min a 4°C.
12. Descartar el sobrenadante y secar el sedimento en centrífuga (Speed Vac).
13. Resuspender el sedimento en 10 µl de tampón TE.
14. Observar concentración en gel de agarosa al 0,7%.

### 4.8.- SECUENCIACIÓN DE DNA

La secuenciación de los distintos fragmentos de DNA se efectuó a través del empleo del kit *fmo*<sup>®</sup> *DNA Cycle Sequencing System*, de Promega. En este kit, el método utilizado es el de Sanger (1977) o método de dideoxi de finalización de cadena, el cual se sustenta en la capacidad de los dideoxinucleótidos (ddNTP) de actuar como finalizadores de cadena, ya que al no poseer el grupo 3' hidroxilo, no pueden formar el enlace fosfodiéster necesario para la incorporación del siguiente deoxinucleótido; de manera que bloquean la elongación de una cadena que se está sintetizando.

La secuenciación se lleva a término en cuatro reacciones independientes. Todas ellas contienen el DNA que actúa como molde y que corresponde al fragmento de DNA que va a ser secuenciado, un cebador de unos 17-23 nucleótidos complementarios al extremo 5' de la cadena molde, los cuatro deoxinucleótidos (uno de ellos marcado) y la Taq DNA polimerasa (Promega, 2002)

La Taq DNA polimerasa es una enzima termoestable que replica el DNA a 70°C. Se obtuvo inicialmente de *Thermus aquaticus*, (cepa YT1) y fue posteriormente modificada de acuerdo a los procedimientos desarrollados por Promega.

### Protocolo

1. Preparación de la Cámara de PCR.
  - Dejar irradiar con UV por 15 min en cámara de flujo el siguiente material: pipetas, puntas de micropipetas (de diferentes volúmenes), gradilla conteniendo mínimo 5 tubos Eppendorff, sobre una base de hielo y otros) rotulados en el siguiente orden.
    - Eppendorff 1 → (Para mezcla de reacción).
    - Eppendorff 2 (verde) ddATP
    - Eppendorff 3 (rojo) ddTTP
    - Eppendorff 4 (azul) ddCTP
    - Eppendorff 5 (amarillo) ddGTP
  - Preparación de Mezcla de Reacción.- La cual esta preparada para un volumen final de 16µl:
    - Buffer de marcaje 5 µl
    - Primer up (directo) marcado(10 pmol/µl), o Primer rev (reverso)(10 pmol/µl) 1,5 µl
    - Taq polimerasa (*T. aquaticus*) 1 µl
    - H<sub>2</sub>O (MQ) (hasta un volumen final de 25µl) 8 µl
    - DNA : plasmídico 0,5µl
2. Adicionar 2 µl de cada uno de los ddNTPs en cada Eppendorff (depositarlos en fondo de tubo)
3. Adicionar 4 µl de la mezcla de reacción a cada uno de los Eppendorff señalados
4. Efectuar PCR de acuerdo con las especificaciones de kit f-mol.
5. Concluida la PCR, detener la reacción con 3 µl de solución Stop de secuenciación y almacenar a 4° hasta el momento de la electroforesis de secuenciación.
6. Secuenciación mediante equipo de Pharmacia Biotech, mod. ALF Express

### 4.9.- TRATAMIENTO INFORMÁTICO

En las diferentes etapas del trabajo ha sido necesario recurrir a una serie de herramientas informáticas, las cuales han facilitado el análisis de ciertos resultados, así como la debida comprobación de ellos, entre ellas podemos citar las siguientes páginas web:

- <http://bioinformatics.org/savvy>: Página destinada a la construcción de plásmidos.
- [www.promega.com/faq/GeneEditor.html](http://www.promega.com/faq/GeneEditor.html): Página de Promega que brinda la secuencia específica de los plásmidos utilizados.

- <http://mcb.berkeley.edu/abs/berger/structures%20pages/structures-frame.html>: Pagina que muestra un conjunto de imágenes de biomoléculas.
- <http://www.ucm.es/info/mmol/mm2.htm>: Página con direcciones útiles de microbiología molecular, con distintas secciones en bioinformática, microbiología, colecciones de cultivos tipo, etc.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> Comprobación de secuencias.

## *IV.- RESULTADOS*

### 1.- REQUERIMIENTOS GENÉTICOS EN LA MUTAGÉNESIS INDUCIDA POR CIPROFLOXACINA

#### 1.1.- REQUERIMIENTO DEL OPERON *moa*

Como se ha indicado anteriormente, estudios actuales con cepas de *Salmonella enterica* Serov. Typhimurium que presentan la región *uvrB* delecionada, son sensibles a la mutagénesis mediada por ciertos compuestos químicos. Sin embargo, en cepas de *E. coli* que poseen mutaciones puntuales en *uvrB* y *uvrA*, la mutagénesis detectada con alguno de estos compuestos es inferior o inexistente. De ello se ha sugerido que la deleción de genes próximos a *uvrB*, como los involucrados en la biosíntesis de cofactores de molibdeno, podrían intervenir en tal mutagénesis y no necesariamente el sistema NER (Anderson, *et al.* 2000; Porwollik, 2000).

Consecuencia de ello, uno de los objetivos planteados en este trabajo ha sido determinar si la región génica que contiene alguno de los genes involucrados en la biosíntesis de cofactores de molibdeno, como el operón *moa* cuya secuencia se muestra en la Figura 13, podrían jugar algún papel en la mutagénesis debida a quinolonas.

Para ello, se procedió a la clonación de dicha región y a su introducción en cepas de *S. enterica* Serov. Typhimurium que presentaban delecionada una región génica mayor, la cual incluye el operón *moa*, el gen *uvrB*, así como otros genes adyacentes.

Para clonar la región deseada, se diseñaron los cebadores MoaAE up *Eco* RV (-336 pb del inicio del CDS de *moaA*) y MoaAE rv *Eco* RV (+3113 del inicio del CDS de *moaA*) y se amplificó dicha región mediante PCR desde el DNA cromosómico de la cepa salvaje *S. enterica* Serov. Typhimurium LT2. Se obtuvo un fragmento de 3450 pb (Figura 14), flanqueado por las dianas *Eco* RV y se ligó al vector pGEM<sup>®</sup>-T, con lo que se obtuvo el plásmido pUA1027 (Figura 15). Dicho plásmido fue posteriormente introducido en las cepas elegidas de *S. enterica* Serov. Typhimurium.

Paralelamente a este trabajo, y dado que el vector pGEM<sup>®</sup>-T es un plásmido de alto número de copias, se clonó la región que contiene los genes *moa* en el vector pK184 de bajo número de copias. Para ello, se amplificó el operon *moa* vía PCR con los cebadores MoaAE up *Hind* III y MoaAE rv *Hind* III; fragmento que posteriormente se ligó al vector pGEM<sup>®</sup>-T, resultando el plásmido recombinante pUA1042. Este último (previa electroporación en DH5 $\alpha$ <sup>®</sup>) y paralelamente con el vector pK184, son digeridos con la enzima *Hind* III para luego lograr la construcción del plásmido recombinante pUA1041 (Figura 16), cuya comprobación de la construcción se demuestra en la Figura 17.

Las cepas elegidas para la introducción de los plásmidos construidos fueron aquellas que presentaban una menor delección en las regiones adyacentes al gen *uvrB*. En concreto, fueron las cepas de *S. enterica* Serov. Typhimurium TA104 y TA2659. La primera de ellas contiene el plásmido pKM101, portador del operón *mucAB*, que como ya se ha comentado, es un requerimiento necesario en el mecanismo de mutagénesis de las quinolonas, mientras que la segunda cepa carece de dicho operón. Por ello, fue necesario introducirle dicho operón, lo cual se realizó mediante la electroporación del plásmido pUA199. Este plásmido, derivado del pACYC177, había sido obtenido previamente en nuestro laboratorio por ligación de un fragmento de unas 2 Kb del plásmido pICV80 con el vector pACYC177 (Clerch, *et al.* 1995). El fragmento clonado contiene el operón *mucAB* y el plásmido codifica resistencia a la ampicilina.

Una vez obtenido las cepas deseadas (TA104 y TA2659/pUA199) se les introdujeron las construcciones realizadas en los vectores pGEM<sup>®</sup>-T y pK184 y las cepas resultantes se utilizaron para estudiar el papel del operon *moa* en la mutagénesis debida a ciprofloxacina. En la Tabla 10 se presentan los resultados obtenidos con la cepa TA2659. En dicha Tabla puede observarse que la presencia del plásmido pUA199 junto al vector pGEM<sup>®</sup>-T provoca que la cepa sea más sensible a la mutagénesis producida por la ciprofloxacina. Debido a este efecto del vector y del plásmido pUA199 no se continuaron los estudios del efecto de la región *moa* sobre dicha mutagénesis con el plásmido recombinante pGEM<sup>®</sup>-T.*moa* (pUA1027).

Por el contrario, se obtuvieron resultados concluyentes al estudiar la mutagénesis de la ciprofloxacina en la cepa TA104 portadora de los plásmidos pKM101 y pUA1041 (pK184.*moa*). Así, y como se muestra en la Tabla 11, la complementación de las funciones codificadas en la región *moa* no produce un efecto acentuado sobre la mutagénesis debido a la ciprofloxacina, obteniéndose con la cepa TA104 y la portadora del plásmido pK184 (TA104, IM=1,94 y UA1817, IM=1,79) niveles de mutagénesis similares a los de la cepa TA104/pUA1041 (UA1819, IM=1,79).

**Figura 13.-** Secuencia genética del operon *moa* (genes *moaA*, *moaB*, *moaC*, *moaD* y *moaE*) de *S. enterica* Typhimurium LT2.

Up Primer : *MoaAE* up *EcoRV*

diana adicionada para *EcoRV*  
 ↑  
 5' → **gata**tcgac cggctaaaag ac → 3'

Up Primer : *MoaAE* up *HindIII*

diana adicionada para *HindIII*  
 ↑  
 5' → **aagctt**gac cggctaaaag ac → 3''

```

-00301          aattaatt attccccgact accccctttat agcggaggcgg
-00241 ttaccacggc taaatgatata atatacaatgt aaaagtgtga ttttcacgta ttctgtcgct
-00181 aaatagcacg atcatatcgc tatgtatatg tttatatagc gaaagcgtga tggcgaaatt
-00121 gtcatttaca cgctagtatc ggcgtaacca cagtaaacac tctagcctct gcacctgggt
-00061 catttttgat acggtgcttt ggccgtgaca acgtttaacg tttgccacca gggcgagga
000000 agaatgact cgcctcccg tatttgaaa ggtgtac ATG GCTTCACAAC TTACCGATGC
                                     Inicio moaA
+00061 TTTCGCGCGT AAGTTTTACT ACTTGCCTTT GTCGATTACC GATGTGTGTA ACTTTCGTTG
+00121 CACCTACTGT CTGCCGATG GCTACAAACC TGGCGGCGTC ACTAACAACG GTTTCCTTAC
+00181 CGTCGATGAA ATTCGTCGCG TTACGCGCGC TTTTGCCAGT CTTGGCACCG AGAAGGTGCG
+00241 TCTTACCGGC GGCGAGCCTT CATTACGCCG CGATTTTACC GACATCATG CCGCCGTGGG
+00301 TGAAAATGAT GCTATTCGCC AGATCGCGGT GACCACTAAC GGTTATCGAC TGGCGCGCGA
+00361 TGCCGCGAAC TGGCGCGAAG CGGGGCTGAC GGGCGTCAAT GTTAGCGTGG ATAGTCTGGA
+00421 TGCGCGTCAG TTCCATGCGA TTACCGGTCA GGACAAATTC CGCCAGGTGA TGGCGGGCAT
+00481 CGATGCCGCC TTTGACGCCG GTTTCGAAAA GGTGAAAGTC AACACCGTGC TGATGCGCGA
+00541 CGTGAATCAC CATCAGTTGG ATACCTTCCT TGCCTGGATT CAGCCTCGCC CCATTCCAGT
+00601 ACGCTTCATT GAACTTATGG AGACGGGCGA GGGGAGCGAT CTCTCCGCA AACATCATAT
+00661 TTGGGGTTCAG GTATTACGCG ACGAGCTGAT TAAGCGCGGT TGGATCCACC AGCTCCGCCA
+00721 GCGCAGCGAT GGCCCGGCGC AGGTTTTTTG TCATCCCGAT TACGCCGTG AGATCGGCCCT
+00781 CATTATGCCG TATGAAAAAG ATTTCTGCGC CACCTGTAAC CGCCTGCGTG TTTCGTCCGT
+00841 CGGTAAGCTG CATTATGTC TGTTTGGCGA CGGCGGCGTG AGTTTACGCG ACCTGTTACA
+00901 GGATGACGCG CAGCAATACG CGTTGAGGA ACGTATTTCC GACGCGTTGC GGGAGAAAAA
+00961 GCAGACCCAC TTTCTTACC AGAGCAATAC TGGTATTACG CAAAATTTAT CTTACATTGG
+01021 CGGTAAATCC TTAATAAGGA GATTTCCAGT GAGTCAGGTC AGCGCTGAAT TTATCCCGAC
                                     Inicio de moaB
+01081 CCGCATCGCT ATTCTTACTG TTTCCAGCCG ACGCGGCGAA GAAGACGACA CCTCCGGTCA
+01141 TTATCTGCGT GATTTCGGCG AGGAGGCCGG GCATGAAGTG GTGGCGAAAG CCATCGTTAA
+01201 AGAGAACCCT TACGCGATTC GCGCCAGGT TTCCGCCTGG ATCGCCAGTG ATGAGGTGCA
+01261 GGTCGTATTG ATAACCTGGT GGACCGGTTT GACCGAAGGC GATCAGGCGC CGGAAGCGCT
+01321 GTTGCCGCTG TTCGATCGTG AAGTGAAGG ATTTGGCGAA GTGTTTCGCA TGCTCTCGTT
+01381 TGAAGAGATC GGCACCGCAA CTCTGCAGTC GCGCGCGGTA GCTGGCGTGG CGAATAACAC
+01441 CTTGATTTTC GCCATGCCGG GCTCCACAAA AGCGTGCAGA ACCGCATGGG AGAATATCAT
+01501 TGCGCCGCGC CTGGATGCCG GTACACGCC ATGTAATTTT CACCCTCATT TAAAGAAATA
+01561 ACGATGTCGC AATTAACCCA TATAACGCC GCAGGCGAAG CGCACATGGT GGACGTTTCC
                                     Inicio moaC
+01621 GCGAAAGCGG AAACCGTTCG TGAAGCGCGT GCGGAAGCAT TCGTTACCAT GCGTAGTGAA
+01681 ACGCTGGCGA TGATTGTTGA TGGCAAACAC CACAAGGGCG ATGTTTTTCG CACCGCCCGA
+01741 ATTGCCGGTA TTCAGGCCGC CAAACGCACC TGGGAGCTGA TCCCGCTGTG CCACCCGCTA
+01801 CTGCTAAGTA AAGTGGAGAT TCAGCTTCAG GCCGAGCCGG AGCATAACCG CGTGCGTATT
+01861 GAGTCTCTGT GCCGTCTGAC CGGTAAAACC GGCGTCGAAA TGGAAGCGTT AACCGCGCGC
+01921 TCCGTGCGGG CGTTAACCAT CTACGACATG TGCAAAGCGG TACAAAAAGA TATGGTAATT
+01981 GGTCCGGTGC GCCTGCTGGC GAAAAGCGGC GGCAAATCGG GGGATTTTAA GGTGGATGCG
                                     Inicio moaD
+02041 CATGATTAA GTGCTTTTCT TCGCCAGGT TCGCGAGCTT ACAGGAACCTG ACGCGCTGGA
    
```

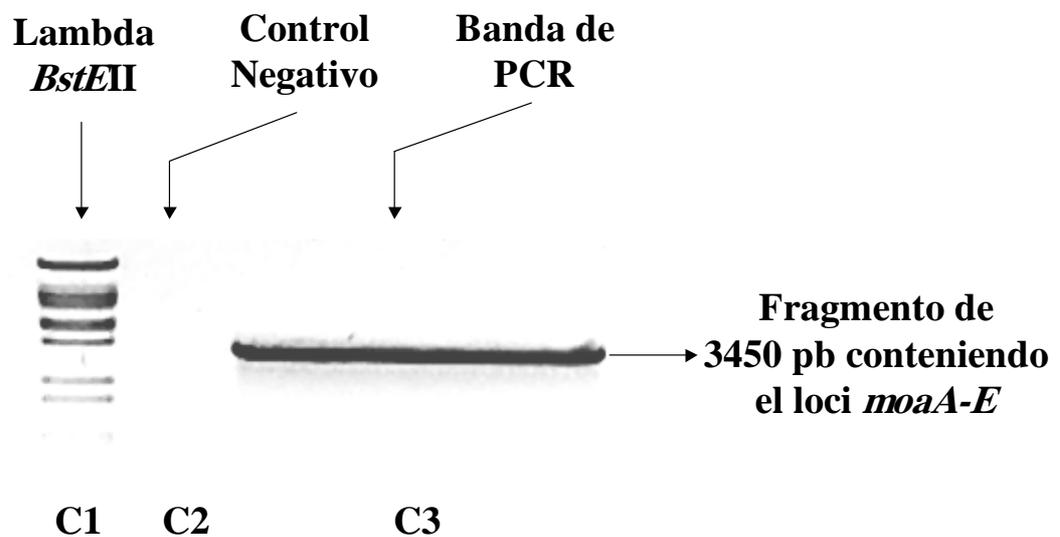
```

+02101 TCTTCCAGCA GATTTTTCCA CCGTTGAGTC GCTGCGACAG CATCTGGCGA CAAAGAGCGA
+02161 TCGTTGGGCG CTGGCGCTGG AAGATGGCAA GCTGTTGGCG GCGGTCAACC AGACGCTGGT
+02221 AAGTTTTGAC CATCCGCTGA CGGCGGGCGA TGAAGTGGCG TTTTTCCC GCAGTCACGGG
+02281 GGGCTAACAT GCACGAAACG CGAATTGTAG TCGGCCCTGC GCCGTTTAGC GTCGGGGAGG
      Inicio moaE
+02341 AATATTCCTG GCTGGCGGCG CGCGACGAAG ACGGCGCGGT CGTCACCTTT ACCGGAAAAG
+02401 TGCGCAATCA TAACCTGGGC GATAGCGTTA AGGCGCTGAC GCTGGAGCAT TATCCC GGCA
+02461 TGACTGAGAA AGCTCTGGCG GAGATCGTCG CAAAGGCGCG TTCCCCTGG CCGCTGGGCG
+02521 GGGTCACGGT GATTCATCGC GTTGGCGAAT TATGGCCGGG CGATGAGATT GTGTTTGTCTG
+02581 GCGTCACCAG CGCGCACCGC AGTAGCGCGT TCGACGCCGG TCAGTTCATT ATGGATTATC
+02641 TGAAAACCCG TGCGCCGTTT TGAAGCGGTG AAGCCACGCC GGAAGGCGAT CGCTGGGTCTG
+02701 AAGCGCGCGA CAGCGACCAG CAGTTGGCGA AACGTTGGTA Gcagaatgtg atacgcttta
+02761 gggatcatt tccacacagg agttcatcat ggacagattt ccacgatctg attcaatagt
+02821 gcaggcgcgg tccggcctgc agacctatat ggcgcaagtg tatggctgga tgacggctcg
+02881 actgttactg acccgcttta tcgcgtggtg tgcggctaata acgccagccg tcatgatgtt
+02941 tgtcttttcc agtaagatca ctttctttgg cttaattatt gccagcttg cgctgggtgtt
+03001 tgttctgtcg ggactggtgc ataaacttag cgccggaatg gcgacgacgc tgtttatgct
+03061 ctattcggcg ctaaccggat tgacgttatc cagtatTTTT atcgtttaca cctactcctc
+03121 tategccagc acgtttgtgg tgacg
  
```

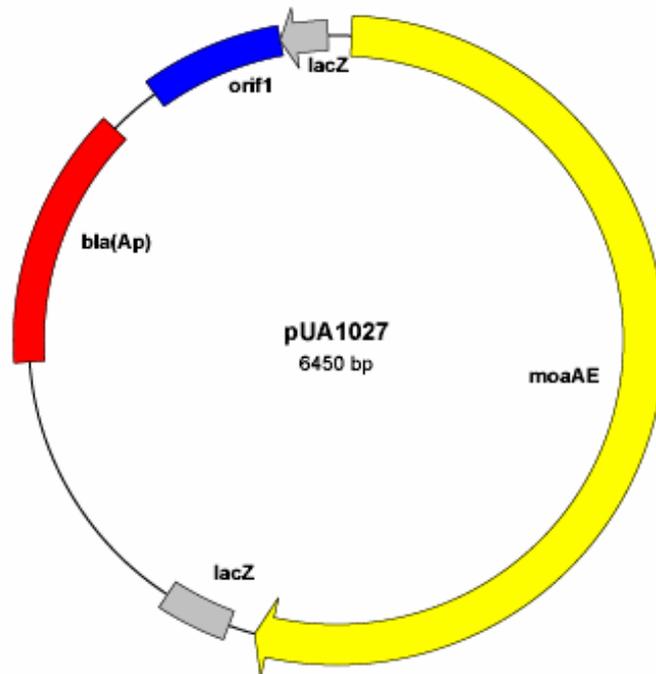
Rv Primer : *MoaAE* rv *EcoRV*  
 3' ← gcaaacacc actgcttatag ← 5'  
 ↓  
 diana adicionada para *EcoRV*

Rv Primer : *MoaAE* rv *HindIII*  
 3' ← gcaaacacc actgcttcgaa ← 5'  
 ↓  
 diana adicionada para *HindIII*

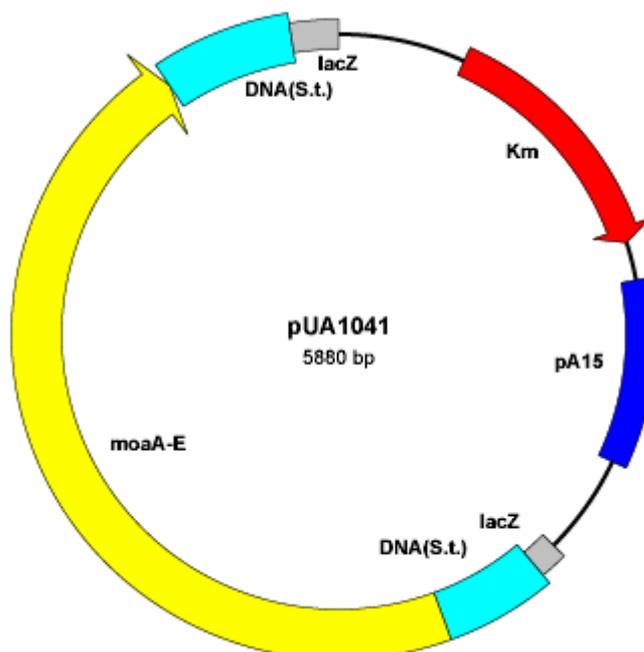
Figura 14.- Electroforesis mostrando el fragmento de PCR conteniendo el operón *moa* de *S. enterica* Typhimurium LT2.



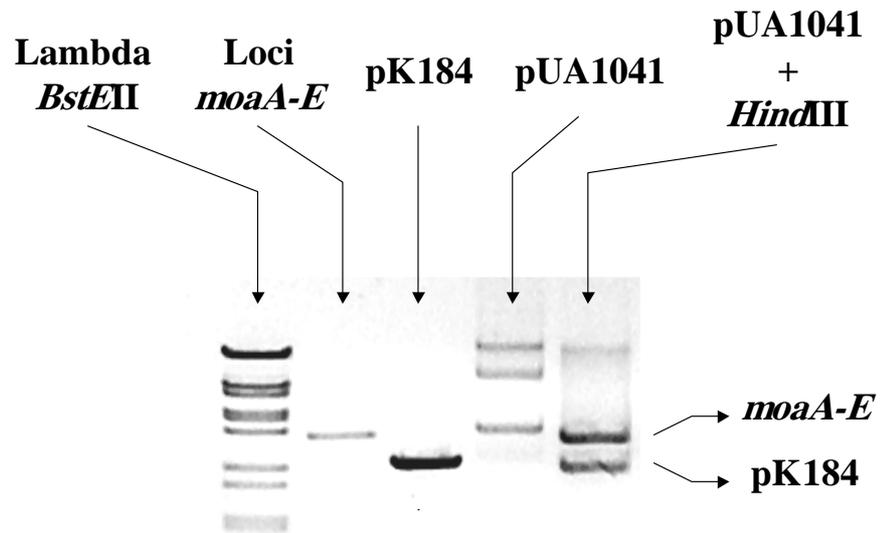
**Figura 15.-** Representación esquemática del plásmido pUA1027, producto de la ligación del fragmento conteniendo el operón *moa* en el vector pGEM<sup>®</sup>-T.



**Figura 16.-** Representación esquemática del plásmido pUA1041, producto de la ligación del fragmento conteniendo el operón *moa* en el vector pK184.



**Figura 17.-** Electroforesis mostrando la liberación del operón *moa* del plásmido pK184, mediante digestión con *Hind*III del plásmido pUA1041.



**Tabla 10.-** Efecto del plásmido pUA199 sobre la mutagénesis debida a ciprofloxacina en cepas de *S. enterica* Typhimurium TA2659.

CEPA		NÚMERO DE REVERTIENTES POR PLACA						
		Concentración de Ciprofloxacina (µg/placa)						
		0	0,00325	0,00612	0,0125	0,025	0,05	0,1
TA2659 ( <i>hisG428</i> )	Media	7,9	8,9	9,3	9,4	9,6	8,3	6,3
	SD	2,7	2,2	2,3	2,3	2,4	2,4	1,9
	IM		1,12	1,17	1,18	1,22	1,04	0,79
UA1805 (TA2659 / pGEM)	Media	8,4	7,5	8,9	7,3	9,3	8,1	2,9
	SD	2,8	3,9	2,5	2,1	3,2	4,3	2,4
	IM		0,89	1,06	0,86	1,10	0,97	0,34
UA1806 (TA2659 / pUA199)	Media	239,3	295,5	323,1	402,5	481,0	485,6	234,9
	SD	41,9	26,9	30,1	61,7	62,8	106,7	57,4
	IM		1,23	1,35	1,68	2,01	2,03	0,98
UA1812 (TA2659 / pGEM / pUA199)	Media	197,8	206,3	258,5	335,8	446,3	560,0	279,0
	SD	17,5	3,6	16,1	29,4	18,8	57,6	75,1
	IM		1,04	1,35	1,70	2,26	2,83	1,41

**Tabla 11.-** Efecto del operon *moa* sobre la mutagénesis debida a la ciprofloxacina en cepas de *S. enterica* Typhimurium TA104.

CEPAS		NÚMERO DE REVERTIENTES POR PLACA						
		Concentración de Ciprofloxacina (µg/placa)						
		0	0,0032	0,0061	0,0125	0,025	0,05	0,1
<b>TA104</b> <i>(hisG428</i> <i>/ pKM101)</i>	Media	398,2	648,5	681,7	774,0	738,0	522,0	154,0
	SD	35,37	38,07	51,62	52,74	10,00	30,01	40,35
	IM	0	1,63	1,71	1,94	1,85	1,31	0,39
<b>UA1817</b> <i>(TA104 /</i> <i>pK184)</i>	Media	82,88	110,0	115,0	158,7	187,5	149,0	28,38
	SD	23,90	35,20	41,10	41,74	36,67	60,95	15,53
	IM	0	1,33	1,39	1,92	2,26	1,80	0,34
<b>UA1819</b> <i>(TA104 /</i> <i>pUA1041)</i>	Media	290,4	320,5	346,0	476,7	519,0	430,0	108,2
	SD	11,5	37,17	48,62	17,46	33,65	31,7	10,87
	IM	0	1,1	1,19	1,64	1,79	1,48	0,37

### 1.2.- REQUERIMIENTO DE LA ACTIVIDAD UvrB

Los antecedentes sostienen que la actividad de la proteína UvrB es necesaria para la mutagénesis mediada por ciprofloxacina (Gocke, 1991; Clerch, *et al.* 1996a). No obstante, los estudios de cepas con la delección  $\Delta uvrB$  han cuestionado dicho requerimiento (Kozmin, *et al.* 2000; Porwollik, *et al.* 2001). Para clarificar este aspecto es que se emprende el estudio de este requerimiento durante la mutagénesis por ciprofloxacina.

Para ello, siguiendo la misma estrategia efectuada para el operón *moa*, se decidió complementar dicha mutación *uvrB* en la cepa TA104, cuyas características ya han sido comentadas anteriormente.

De modo inicial, se amplificó vía PCR el gen *uvrB*, cuya secuencia se muestra en la Figura 18, a partir del DNA cromosómico de *S. enterica* Serov. Typhimurium LT2. Para ello se diseñaron los cebadores UvrB up *Eco* RV a -558 pb del inicio del CDS de *uvrB* y UvrB rv *Eco* RV a +2055 pb del inicio del CDS de *uvrB*, que proveyó un fragmento de DNA de 2614 pb conteniendo al gen *uvrB* y, que a la vez, incluía las dianas de restricción para *Eco* RV, tal como se observa en la Figura 19. Este fragmento se ligó al vector de clonación pGEM<sup>®</sup>-T, denominándose en adelante plásmido pUA1029, el cual se ve esquematizado en la Figura 20. De esta construcción se recuperó el fragmento conteniendo el gen *uvrB* mediante digestión con *Sph* I y *Sac* I (Figura 21), que posteriormente se ligó al vector pK184, previa digestión de este último también con *Sph* I y *Sac* I, dando origen a la obtención del plásmido pUA1040, representado en la Figura 22.

Una vez obtenida la construcción deseada, se introdujo en la cepa TA104 mediante electroporación (cepa UA1818), comprobándose su fenotipo Uvr<sup>+</sup>, irradiando dicha cepa, junto con los controles adecuados con diferentes dosis de radiación UV (Figura 23). Con la cepa obtenida se abordaron los estudios de mutagénesis a diferentes dosis de ciprofloxacina.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 12, en donde puede apreciarse que la complementación de la mutación *uvrB* (TA104/pUA1040) provoca

---

## RESULTADOS

un mayor aumento del índice de mutagénesis del orden del 3,08 a una concentración de 0,025  $\mu\text{g/placa}$ , frente a aquellas que lo adolecían (TA104, IM=1,94-1,85) o que sólo presentaban adicionalmente el plásmido pK184 (UA1817, IM=2,26).

Figura 18.- Secuencia genética del gen *uvrB* de *S. enterica* Typhimurium LT2.

Primer Up : *UvrB* up *EcoRV*

diana adicionada para *EcoRV*

↓5' ↑  
**gatatac** gcgtctacgc etc → 3'

-00541 aatTTTT cccttctcgt tagcca**ataa tct**gccaaaa atagcgataa  
 P3

-00481 ttttttttta tcgcccggcg aaaacgtcag gagctgattt tgccaggcgg caggggatac  
 -00421 gggctggaag cagttatcca ctattcctgt ggataacctt gtgtattaga gttagaaaac  
 -00361 acaacgtaag cgagaggcga cgcggcctgc gactaaattg gcgcgaaaga cggcttgaga  
 -00301 aaatatccct tttcagacag caagttatat aaaatcaatg gttgtaaagg aagggggata  
 -00241 gattgacata aaactttcat catccgactt gacaaatgtt aaaaaagact ctggtctggy  
 -00181 gataaccagc acactgctgg aatTTTacc cgcgactgtc tatgttttac ctctaaatag  
 -00121 cgtgggggat ctgccgatag ccattataca ctggagtgtt **actgtttttt catccagtat**  
 ↓ - 35 ↓  
 unión de LexA

-00061 tttttatt**gg caatatt**cac cgctcgagagt aaaattacac ccctgcccgc tcaactcctc  
 - 10

00000 aggtagccgc tc**ATGAGTAA ACCGTTCAA CTGAATCCG CTTTTAAAC TTCTGGCGAT**  
 Inicio

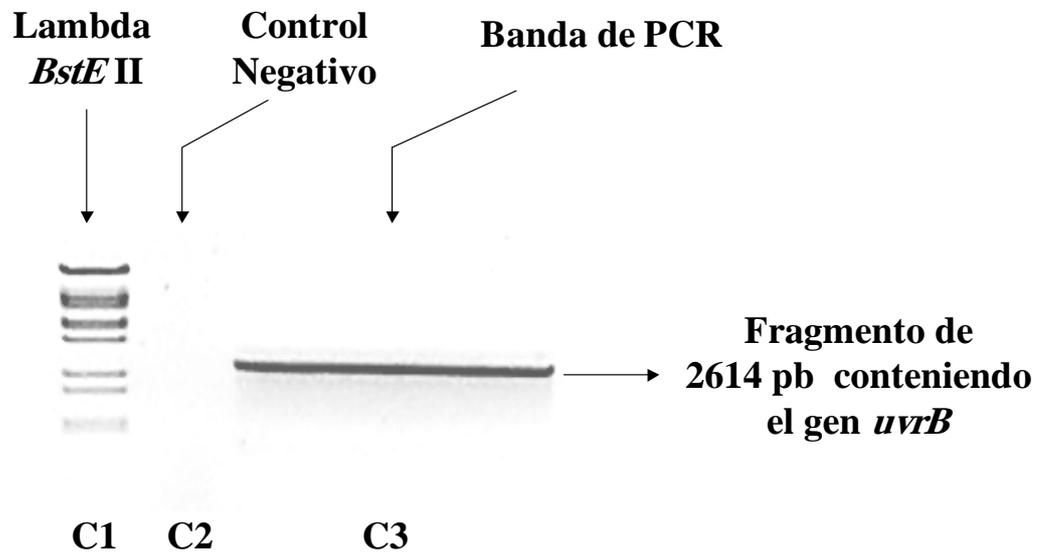
+00061 **CAGCCGGACG CTATACGTCG TCTGGAAGAG GGGCTGGAGG ACGGGCTGGC GCATCAGACG**  
 +00121 **TTATTGGGCG TGACCGGCTC CGGGAAGACA TTCACCATTG CCAACGTCAT TGCGGACTTG**  
 +00181 **CAGCCGCCAA CGATGGTGCT TGCGCCCAAT AAAACCCTGG CCGCGCAGCT CTACGGCGAA**  
 +00241 **ATGAAAGAGT TTTTCCCGGA AAACGCGGTC GAGTATTTTC TCTCCTACTA TGACTACTAT**  
 +00301 **CAGCCGGAAG CGTATGTGCC AAGCTCGGAT ACGTTTATCG AAAAAGACGC TTCTGGTAAAC**  
 +00361 **GAACATATTG AGCAAATGCG GTTGTGCGCA ACGAAAGCGT TGCTTGAGCG ACGCGATGTC**  
 +00421 **GTGGTGGTGG CTTCCGTGTC CGCGATTTAC GGTCTGGGCG ATCCGGATCT CTACCTGAAA**  
 +00481 **ATGATGCTGC ATCTGACGGT GGAATGCTG ATTGACCAGC GCGCGATTTT GCGTCCGCTG**  
 +00541 **GCGGAATTGC AATACACCCG TAACGATCAA GCTTTTCAGC GTGGTACCTT TCGCGTCCGC**  
 +00601 **GGCGAAGTGA TCGACATCTT CCCGGCTGAA TCTGACGACA TCGCGCTACG CGTTGAGCTG**  
 +00661 **TTTGATGAAG AAGTGAACG CCTGTCCGTC TTCGACCCGT TAACCGGGCA GGTAGAGTCA**  
 +00721 **ACGGTGGCAC GTTATACTAT CTATCCCAA ACGCACTACG TAACGCGCGC CGAGCGTATT**  
 +00781 **CTGCAGGCGA TGGAAGAGAT AAAAGATGAG CTGGCGGACA GCGGTAAGGT CTTGCTGGCG**  
 +00841 **AATAATAAGC TGCTCGAAGA GCAGCGATTA AGCCAGCGCA CGCAGTTCGA TTTAGAGATG**  
 +00901 **ATGAACGAGC TGGGCTACTG CTCAGGCATT GAAAATATT CCCGCTTTCT GTCGGGCCGC**  
 +00961 **GGGCCGGGCG AACCGCCGCC AACCTTGTT CATTATCTGC CCGCCGACCG ACTGCTGGTG**  
 +01021 **GTTGATGAGT CTCATGTCAC CATCCCGCAG ATAGGTGGCA TGTACCAGCG CGACCGGGCG**  
 +01081 **CGCAAAGAGA CGCTGGTCGA GTATGGCTTC CGTCTGCCTT CGGCGCTGGA TAACCGTCCG**  
 +01141 **CTGAAGTTTG AGGAGTTTGA AGCCTTAGCG CCGCAAAC TA TCTATGTTTC CGCCACGCC**  
 +01201 **GGCAACTATG AGCTGGAAAA ATCTGGTGAT GAGGTGGTGG ATCAGGTCGT GCGACCGACC**  
 +01261 **GGGCTGCTGG ACCCGATTAT TGAAGTGCCT CCGGTGGCGA CCCAGGTGGA CGATCTGCTG**  
 +01321 **TCCGAAATTC GTCAGCGTGC GGCCATTAAT GAGCGTGTCC TTGTCACTAC GCTTACCAA**  
 +01381 **CGGATGGCGG AAGATTTGAC CGAATATCTG GAAGAGCACG GCGAGCGCGT GCGTTACCTG**  
 +01441 **CACTCAGATA TTGATACCGT GGAGCGCATG GAAATCATCC GCGATTTGCG TCTGGGCGAG**  
 +01501 **TTTGACGTTT TGGTGGGGAT TAACCTGCTG CGCGAAGGCG TGGATATGCC GGAAGTCTCG**  
 +01561 **CTGGTGGCGA TTCTGGACGC CGATAAAGAG GGCTTCTGCG GCTCCGAGCG CTCCCTGATT**  
 +01621 **CAGACCATAG GCGCGCGGCG GCGTAACGTT AACGGTAAAG CGATTCTGTA TGGCGATAAA**  
 +01681 **ATCACGCCGT CGATGGCGAA GCGGATTGCG GAAACCGAGC GACGTCGCGA GAAGCAGCAG**  
 +01741 **AAGTACAACG AAGAGCACCG TATCACTCCG CAGGGGCTGA ACAAAAAAGT GGTCGACATC**  
 +01801 **CTGGCGCTGG GGCAGAACAT TGCGAAAACC AAAGCGAAGG GGAAAGGCAA GGGCCGTTCT**  
 +01861 **ACGGCAAAAG CCGGAATTGT CGAATCGGAT ATGACGCCGA AAGCGTTGCA CGAGAAAATT**  
 +01921 **CATGAACTGG AAGGGCAAAT GATGCAGCAC GCGCAAAATC TGGAGTTTGA AGAAGCCGCG**  
 +01981 **CAAATTCGCG ACCAGTTGCA CCAGTTACGC GAGTTGTTTA TCGCGGCGTC CTGAcaatgt**  
 +02041 gtcgategcc agcgagtcac cg

Rv Primer : *UvrB* rv *EcoRV*

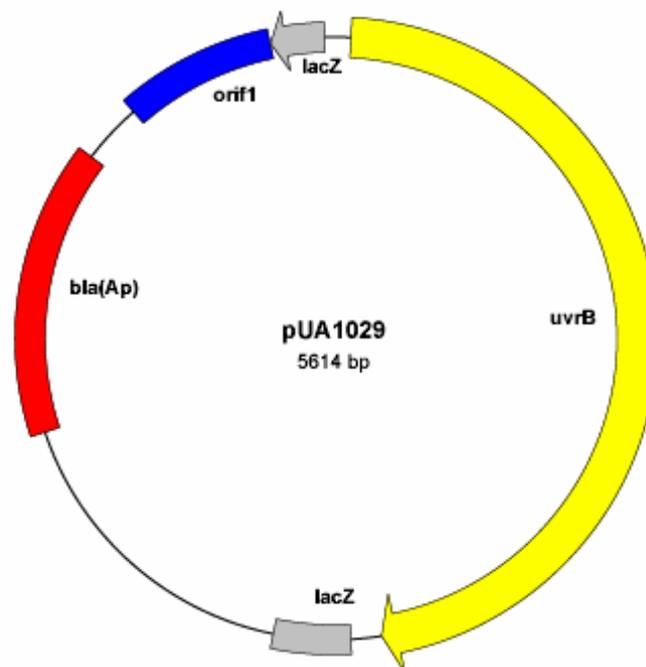
3' ← cggtcagta gcctatag ← 5'

↓  
 diana adicionada para *EcoRV*

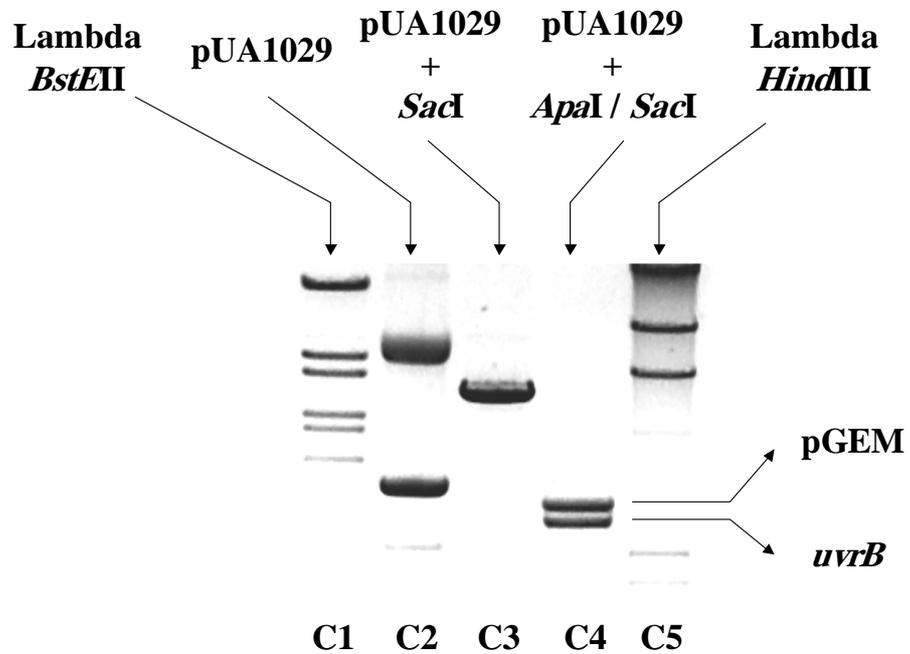
**Figura 19.-** Electroforesis mostrando el fragmento de PCR conteniendo el gen *uvrB* de *S. enterica* Typhimurium LT2.



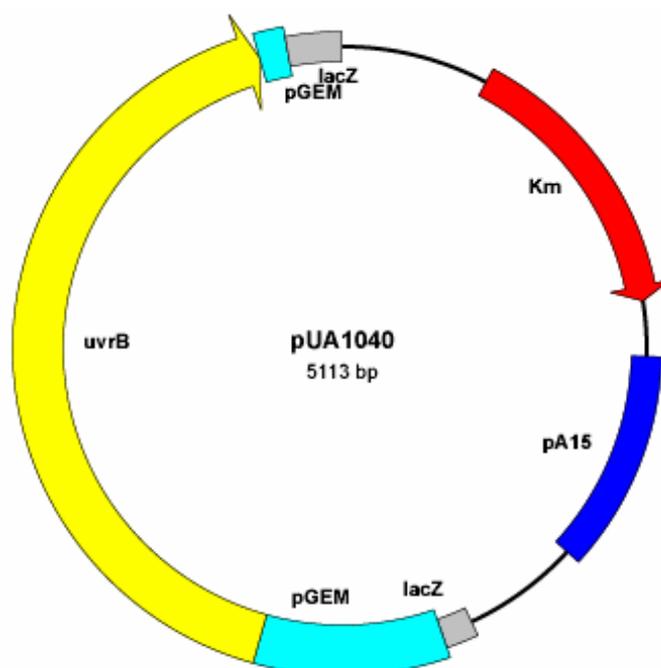
**Figura 20.-** Representación esquemática del plásmido pUA1029, producto de la ligación del fragmento conteniendo el gen *uvrB* en el vector pGEM<sup>®</sup>-T.



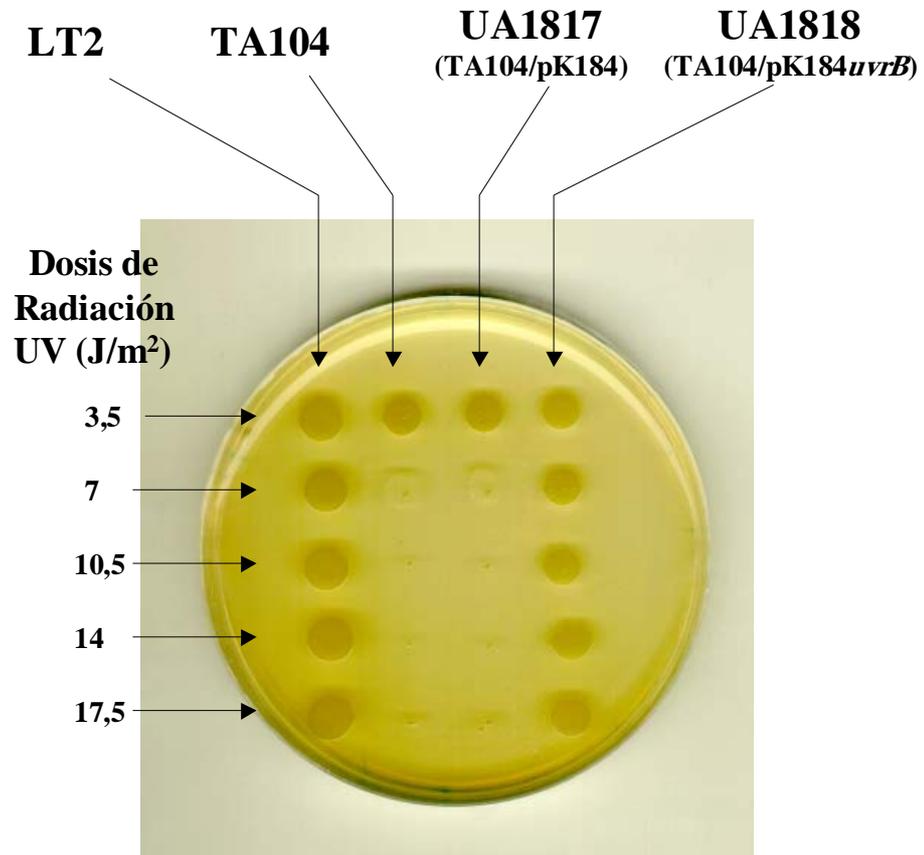
**Figura 21.-** Electroforesis mostrando la liberación de fragmento *uvrB* del pGEM<sup>®</sup>-T, mediante digestión con *Apa* I / *Sac* I del plásmido pUA1029.



**Figura 22.-** Representación esquemática del plásmido pUA1040, producto de la ligación del fragmento conteniendo el gen *uvrB* en el vector pK184.



**Figura 23.-** Placa mostrando la sensibilidad a la radiación UV de las construcciones UA1817 y UA1818.



**Tabla 12.-** Efecto del gen *uvrB* sobre la mutagénesis debida a la ciprofloxacina en cepas de *S. enterica* Typhimurium TA104.

CEPAS		NÚMERO DE REVERTIENTES POR PLACA						
		Concentración de Ciprofloxacina ( $\mu\text{g/placa}$ )						
		0	0,0032	0,0061	0,0125	0,025	0,05	0,1
<b>TA104</b> ( <i>hisG428</i> / pKM101)	Media	398,2	648,5	681,7	774,0	738,0	522,0	154,0
	SD	35,37	38,07	51,62	52,74	10,00	30,01	40,35
	IM		1,63	1,71	1,94	1,85	1,31	0,39
<b>UA1817</b> (TA104 / pK184 <sup>®</sup> )	Media	82,88	110,0	115,0	158,7	187,5	149,0	28,38
	SD	23,90	35,20	41,10	41,74	36,67	60,95	15,53
	IM		1,33	1,39	1,92	2,26	1,80	0,34
<b>UA1818</b> (TA104 / pUA1040)	Media	46,50	59,50	68,38	102,0	143,1	142,1	91,63
	SD	13,84	20,74	16,50	33,68	45,22	33,73	13,10
	IM		1,28	1,47	2,19	3,08	3,06	1,97

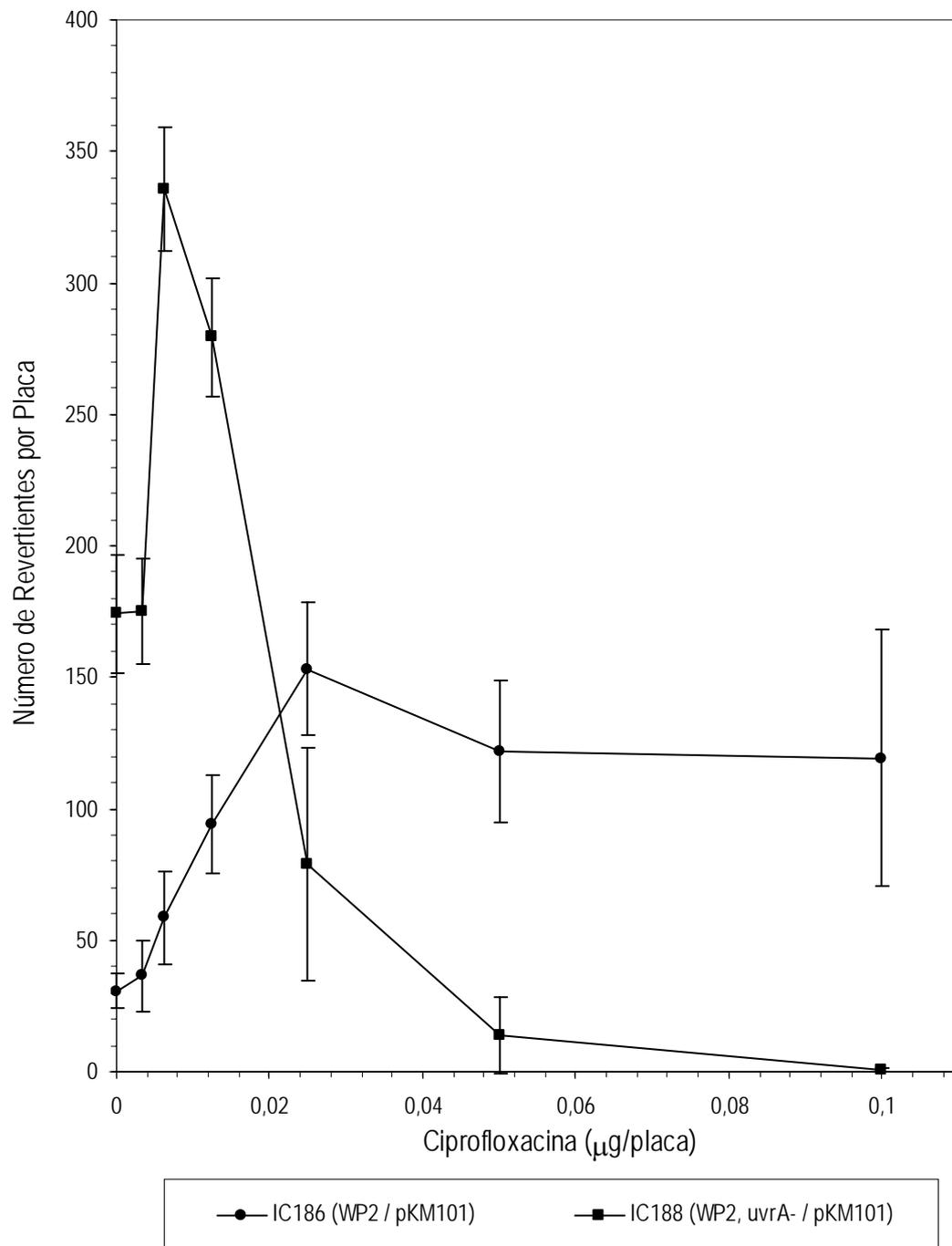
**1.3.- REQUERIMIENTO DE LA ACTIVIDAD UvrA**

Se propuso la ampliación del estudio abordando la actividad del gen *uvrA* durante la mutagénesis por ciprofloxacina. En este caso las experiencias se efectuaron sobre el sistema de retromutación de *E. coli* WP2 con la cepa IC188 portadora del plásmido pKM101 y de una mutación puntual en el gen *uvrA*. Al igual que en los casos anteriores se ensayaron seis concentraciones diferentes de ciprofloxacina.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 13, e indican que la ausencia de la actividad *uvrA* provoca un significativo descenso de la mutagénesis producida por la ciprofloxacina (IC188, IM=1,92), frente a la silvestre (IC186, IM=5,0). Así, y como se muestra gráficamente en la Figura 24, la cepa defectiva en UvrA únicamente es capaz de ser mutable por dicho antimicrobiano a una concentración muy baja (0,00612 µg/placa) y concentraciones superiores a 0,012 µg/placa provocan ya mortalidad celular.

**Tabla 13.-** Efecto del gen *uvrA* sobre la mutagénesis debida a la ciprofloxacina en cepas de del sistema *E. coli* WP2.

CEPA		NÚMERO DE REVERTIENTES POR PLACA						
		Concentración de Ciprofloxacina (µg/placa)						
		0	0,00325	0,00612	0,0125	0,025	0,05	0,1
<b>IC186 (WP2 / pKM101)</b>	Media	30,6	36,3	58,7	94,1	153,3	122,1	119,4
	SD	6,5	13,4	17,7	18,5	25,1	27,0	48,6
	IM		1,19	1,91	3,07	5,00	3,98	3,90
<b>IC188 (WP2, <i>uvrA</i><sup>-</sup> / pKM101)</b>	Media	174,2	174,9	335,5	279,3	78,7	13,8	0,4
	SD	22,6	20,0	23,4	22,3	44,4	14,8	0,7
	IM		1,00	1,92	1,60	0,45	0,07	0,00



**Figura 24.-** Número de revertientes por placa a diferentes dosis de ciprofloxacina, en cepas *uvrA*<sup>-</sup> y *uvrA*<sup>+</sup> de *E. coli* WP2.

### 2.- PRODUCCIÓN DE LESIONES OXIDATIVAS POR LA CIPROFLOXACINA

Además de las primeras indicaciones que ya sugerían que las quinolonas podían ser agentes oxidativos, en la actualidad existen más estudios que refuerzan esta sugerencia, sobre todo aquellas que se refieren a la fotooxidación de algunas de estas moléculas. Por ello, uno de los objetivos de este trabajo ha sido determinar si la ciprofloxacina puede introducir algún tipo de daño oxidativo en el DNA y, consecuentemente generar mutaciones a través de este tipo de lesiones.

Para abordar este estudio, inicialmente se escogieron cepas bacterianas derivadas de *E. coli* WP2, defectivas en la respuesta al daño generado por peróxido de hidrógeno (OxyR<sup>-</sup>) y por el oxígeno singlete (SoxRS<sup>-</sup>). Las cepas escogidas fueron la IC202 ( $\Delta oxyR30$ ) y la ZA700 (WP2, *uvrA*, *soxRS*) (Martinez, *et al.* 1999; Martinez, *et al.* 2000). La primera de ellas posee el plásmido pKM101, el cual se requiere para detectar la mutagénesis producida por las quinolonas, mientras que la segunda carece de dicho plásmido. Por ello, y mediante conjugación, se obtuvo la cepa ZA700/pKM101, la cual fue usada en los diferentes experimentos de mutagénesis.

Los resultados obtenidos con la cepa OxyR<sup>-</sup> se presentan en la Tabla 14, donde puede observarse que la deficiencia en la respuesta al daño oxidativo no afecta el nivel de mutagénesis detectada. Los resultados indicados anteriormente fueron corroborados, en cepas isogénicas a las anteriores, pero defectivas en la actividad UvrA. Así, en la Tabla 15 puede observarse que ambas cepas presentan niveles similares de mutagénesis, si bien menores que sus respectivas cepas isogénicas UvrA<sup>+</sup> (Tabla 14 y 15)

En contraste con lo indicado anteriormente, los resultados obtenidos con la cepa *soxRS*<sup>-</sup> apuntan a que las quinolonas deben ser agentes oxidativos. Así, y como se muestra en la Tabla 16, la cepa SoxRS<sup>-</sup> es mucho más sensible a la mutagénesis mediada por la ciprofloxacina que la cepa que presenta una respuesta SoxRS normal. En la Figura 25 puede apreciarse la relación dosis respuesta para ambas cepas.

## RESULTADOS

**Tabla 14.-** Efecto de la deficiencia en OxyR sobre la mutagénesis mediada por ciprofloxacina en *E. coli*.

CEPA		NÚMERO DE REVERTIENTES POR PLACA Concentración de Ciprofloxacina ( $\mu\text{g/placa}$ )						
		0	0,00325	0,00612	0,0125	0,025	0,05	0,1
<b>IC186</b> (WP2 / pKM101)	Media	30,6	36,3	58,7	94,1	153,3	122,1	119,4
	SD	6,5	13,4	17,7	18,5	25,1	27,0	48,6
	IM		1,19	1,91	3,07	5,00	3,98	3,90
<b>IC202</b> (WP2, $\Delta\text{oxyR30}$ /pKM101)	Media	35,5	38,3	64,9	104,6	156,2	109,3	34,6
	SD	9,8	6,4	7,6	10,2	14,1	18,9	18,2
	IM		1,08	1,83	2,94	4,40	3,08	0,97

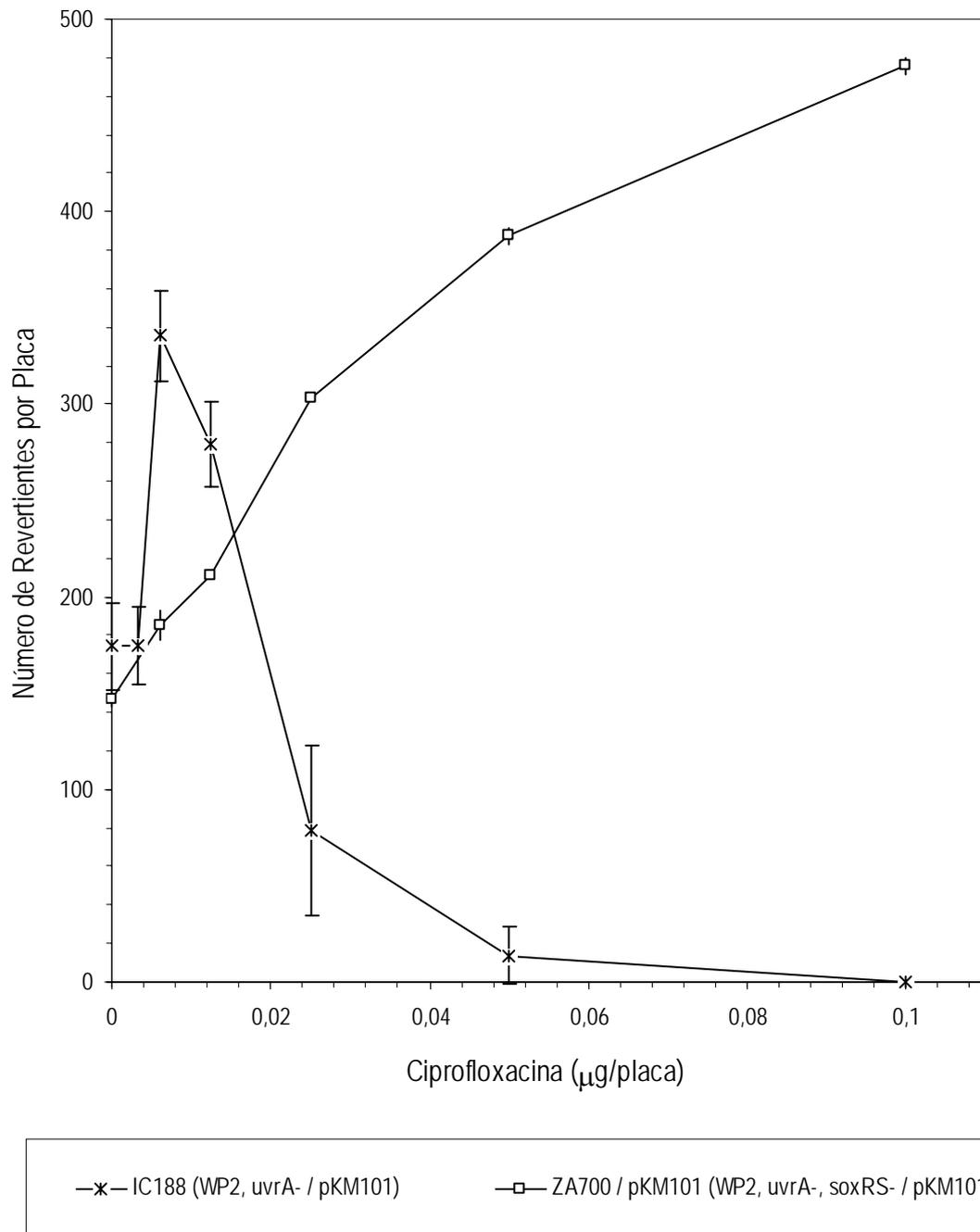
**Tabla 15.-** Efecto de la deficiencia en OxyR sobre la mutagénesis mediada por ciprofloxacina en cepas de *E. coli uvrA*.

CEPA		NÚMERO DE REVERTIENTES POR PLACA Concentración de Ciprofloxacina ( $\mu\text{g/placa}$ )						
		0	0,00325	0,00612	0,0125	0,025	0,05	0,1
<b>IC188</b> (WP2, $uvrA^-$ / pKM101)	Media	174,2	174,9	335,5	279,3	78,7	13,8	0,4
	SD	22,6	20,0	23,4	22,3	44,4	14,8	0,7
	IM		1,00	1,92	1,60	0,45	0,07	0,00
<b>IC203</b> (WP2, $uvrA^-$ , $\Delta\text{oxyR30/pKM101}$ )	Media	145,5	174,0	256,9	249,1	128,6	22,8	1,7
	SD	21,9	19,0	25,7	33,8	14,7	21,1	2,1
	IM		1,20	1,77	1,71	0,88	0,16	0,01

**Tabla 16.-** Efecto de la deficiencia en SoxRS sobre la mutagénesis mediada por la ciprofloxacina en cepas de *E. coli uvrA*.

CEPA		NÚMERO DE REVERTIENTES POR PLACA Concentración de Ciprofloxacina ( $\mu\text{g/placa}$ )						
		0	0,00325	0,00612	0,0125	0,025	0,05	0,1
<b>IC188</b> (WP2, $uvrA^-$ / pKM101)	Media	174,2	174,9	335,5	279,3	78,7	13,8	0,4
	SD	22,6	20,0	23,4	22,3	44,4	14,8	0,7
	IM		1,00	1,92	1,60	0,45	0,07	0,00
<b>ZA700/pKM101</b> (WP2, $uvrA^-$ , $\text{soxRS/pKM101}$ )	Media	147,0	ND*	185,66	211,33	303,67	387,33	475,66
	SD	3,67		7,66	2,00	1,00	4,67	4,33
	IM			1,26	1,43	2,06	2,63	3,23

\* ND, no determinado



**Figura 25.-** Número de revertientes por placa a diferentes dosis de ciprofloxacina en cepas *soxR*<sup>+</sup> y *soxR*<sup>-</sup> de *E. coli* WP2.

## RESULTADOS

Consecuencia de la evidencia de lesiones de tipo oxidativa por parte de la ciprofloxacina, el siguiente paso en este estudio fue determinar el efecto de la deficiencia en las DNA glicosilasas MutM y MutY en la mutagénesis por ciprofloxacina, dado que, y como se ha comentado en la introducción, ambas enzimas participan en la prevención de este tipo de lesiones, que inciden mayormente sobre guaninas (8-hidroxi guaninas).

Para ello se escogieron cepas deficientes en dichas DNA glicosilasas. Una de ellas fue la cepa de *S. enterica* Typhimurium YG3003, isogénica a la cepa TA102 y portadora de una mutación en el gen *mutM*. Mientras que se eligió a la cepa IC3993, derivada de *E. coli* WP2, por presentar una mutación en el gen *mutY*. Dicha cepa carece de los genes *mucAB*, por lo que por conjugación se le transfirió el plásmido pKM101 desde la cepa donadora *S. enterica* Typhimurium TA98, obteniéndose así la cepa *E. coli* IC3993/pKM101.

Los ensayos de mutagénesis obtenidos indican que la ausencia de las actividades DNA glicosilasas estudiadas no producen un aumento significativo en la mutagénesis, respecto a la obtenida con las cepas salvajes para ambas actividades (Tabla 17 y 18).

**Tabla 17.-** Efecto de la deficiencia del gen *mutM* sobre la mutagénesis mediada por ciprofloxacina en *S. enterica* Typhimurium.

CEPA		NÚMERO DE REVERTIENTES POR PLACA						
		Concentración de Ciprofloxacina ( $\mu\text{g/placa}$ )						
		0	0,00325	0,00612	0,0125	0,025	0,05	0,1
TA102 ( <i>hisG428(pAQ1)</i> / pKM101)	Media	250,5	353,3	418	474	825,8	940,3	413,8
	SD	15,4	35,7	102,3	65,8	62	87,5	48,2
	IM		1,41	1,67	1,89	3,30	3,75	1,65
YG3003 ( <i>hisG428(pAQ1)</i> , <i>mutM</i> / pKM101)	Media	302,5	290,5	289,5	338,6	505	1272	648
	SD	15,4	34,1	54	47,2	46,2	59,7	69,7
	IM	00	0,96	0,96	1,12	1,67	4,2	2,14

## RESULTADOS

**Tabla 18.-** Efecto de la deficiencia del gen *mutY* sobre la mutagénesis mediada por ciprofloxacina en *E. coli*.

CEPA		NÚMERO DE REVERTIENTES POR PLACA Concentración de Ciprofloxacina ( $\mu\text{g/placa}$ )						
		0	0,00325	0,00612	0,0125	0,025	0,05	0,1
<b>IC186 (WP2 / pKM101)</b>	Media	30,6	36,3	58,7	94,1	153,3	122,1	119,4
	SD	6,5	13,4	17,7	18,5	25,1	27,0	48,6
	IM		1,19	1,91	3,07	5,00	3,98	3,90
<b>IC3993 (WP2, <i>umuDC</i>, <i>mutY</i>)</b>	Media	46,8	44,0	40,5	41,8	46,3	39,8	23,8
	SD	9,7	6,2	2,5	4,3	3,5	3,5	5,0
	IM		0,94	0,87	0,89	0,99	0,85	0,51
<b>IC3993 / pKM101 (WP2, <i>umuDC</i>, <i>mutY</i> / pKM101)</b>	Media	56,0	60,0	93,7	130,8	264,3	296,3	178,8
	SD	4,2	1,6	5,5	5,9	40,6	24,1	21,1
	IM		1,07	1,67	2,33	4,72	5,29	3,19

### 3.- POTENCIAL MUTAGÉNICO DE QUINOLONAS EN CEPAS DE *S. enterica* Typhimurium y *E. coli*

Para determinar el potencial mutagénico de las quinolonas, se han utilizado los dos ensayos de retromutación indicados en el apartado de Material y Métodos de esta memoria. Las cepas de ensayo han sido *S. enterica* Serov. *typhimurium* TA102 y *E. coli* WP2/pKM101 (IC186) y se eligieron para este estudio las siguientes moléculas:

- Quinolonas de Segunda Generación: Ciprofloxacina (CPX).
- Quinolonas de Tercera Generación: Levofloxacina (LVX), Moxifloxacina (MOX).
- Quinolonas de Cuarta Generación: Trovafloxacina (TVX), Gemifloxacina (GMX), Clinafloxacina (CLX)

En la Tabla 19 se presenta los resultados obtenidos con la cepa *E. coli* WP2/pKM101, en donde puede observarse que todas las quinolonas estudiadas producen un aumento significativo del número de revertientes por placa. Asimismo, a las dosis más altas ensayadas se detectó un claro efecto antibacteriano de la quinolona, disminuyendo el número de revertientes por placa. Resultados análogos se obtuvieron con la cepa TA102 de *S. enterica* Serov. Typhimurium (Tabla 20), si bien se observaron diferencias en la sensibilidad de esta cepa a la acción antibacteriana de las distintas quinolonas.

En las Figuras 26 y 27 se presentan las rectas de regresión de la relación dosis-respuesta obtenidas de los datos presentados en las Tablas 19 y 20, respectivamente, para las diferentes quinolonas estudiadas a dosis no tóxicas. Con el objetivo de poder comparar el potencial mutagénico de las diferentes quinolonas, se calculó la potencia mutagénica de cada una de ellas en función de las rectas de regresión indicadas anteriormente. Dichas potencias se presentan en la Tabla 21.

Finalmente, y para relacionar la potencia mutagénica con la actividad antibacteriana de cada molécula, se determinó la CMI de cada quinolona para las cepas WP2/pKM101 y TA102. Este estudio fue realizado mediante el método de

microdilución (Normativa de la NCCLS) por el grupo del Dr. Jordi Vila (Departament de Microbiologia del Institut Clínic d'Infeccions i Immunologia del Hospital Clínic de Barcelona) en el marco de un proyecto de colaboración. En la Tabla 22 se presentan los valores de CMIs obtenidos, así como el cociente entre dicho valor y la dosis mutagénica máxima para cada quinolona

## RESULTADOS

**Tabla 19.-** Mutagénesis producida por seis quinolonas en la cepa *E. coli* IC186 (WP2/pKM101).

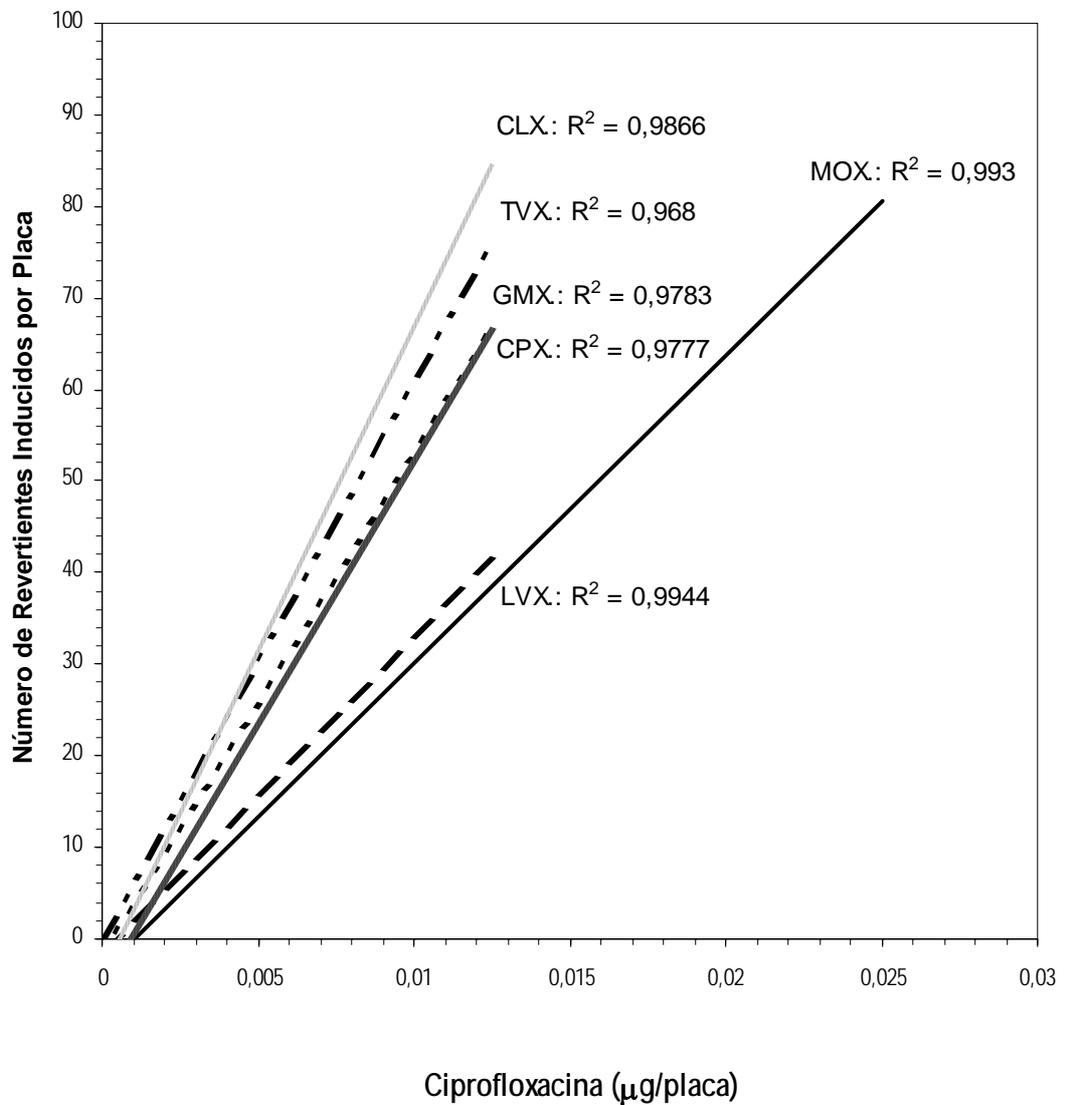
QUINOLONA		NÚMERO DE REVERTIENTES POR PLACA							
		Concentración de Ciprofloxacina ( $\mu\text{g/placa}$ )							
		0	0,00325	0,00612	0,0125	0,025	0,05	0,1	
CPX	Media	25,32	35,5	61,5	90,6	83,3	32,0	T	
	RI	0	10,2	36,2	65,3	58,0	6,7		
	IM	1	1,4	2,43	3,58	3,29	1,26		
CLX	Media	26,1	42,6	59,0	113,5	97,8	17,0	T	
	RI	0	16,5	32,9	87,4	71,7	-9,1		
	IM	1	1,63	2,26	4,35	3,75	0,65		
GMX	Media	26,1	33,3	54,5	94,3	105,3	65,8	T	
	RI	0	7,2	28,4	68,2	79,2	39,7		
	IM	1	1,27	2,09	3,61	4,03	2,52		
LVX	Media	26,1	33,5	45,0	67,7	79,6	20,0	T	
	RI	0	7,4	19,8	41,6	53,5	-6,1		
	IM	1	1,28	1,72	2,59	3,05	0,77		
MOX	Media	26,1	29,1	42,0	66,4	106,6	47,0	29,8	
	RI	0	3,0	15,9	40,3	80,5	20,9	3,7	
	IM	1	1,12	1,61	2,54	4,09	1,80	1,14	
TVX	Media	26,1	39,6	70,8	99,4	83,6	38,0	T	
	RI	0	13,5	44,7	73,3	57,5	11,9		
	IM	1	1,52	2,71	3,81	3,2	1,46		

T = toxicidad

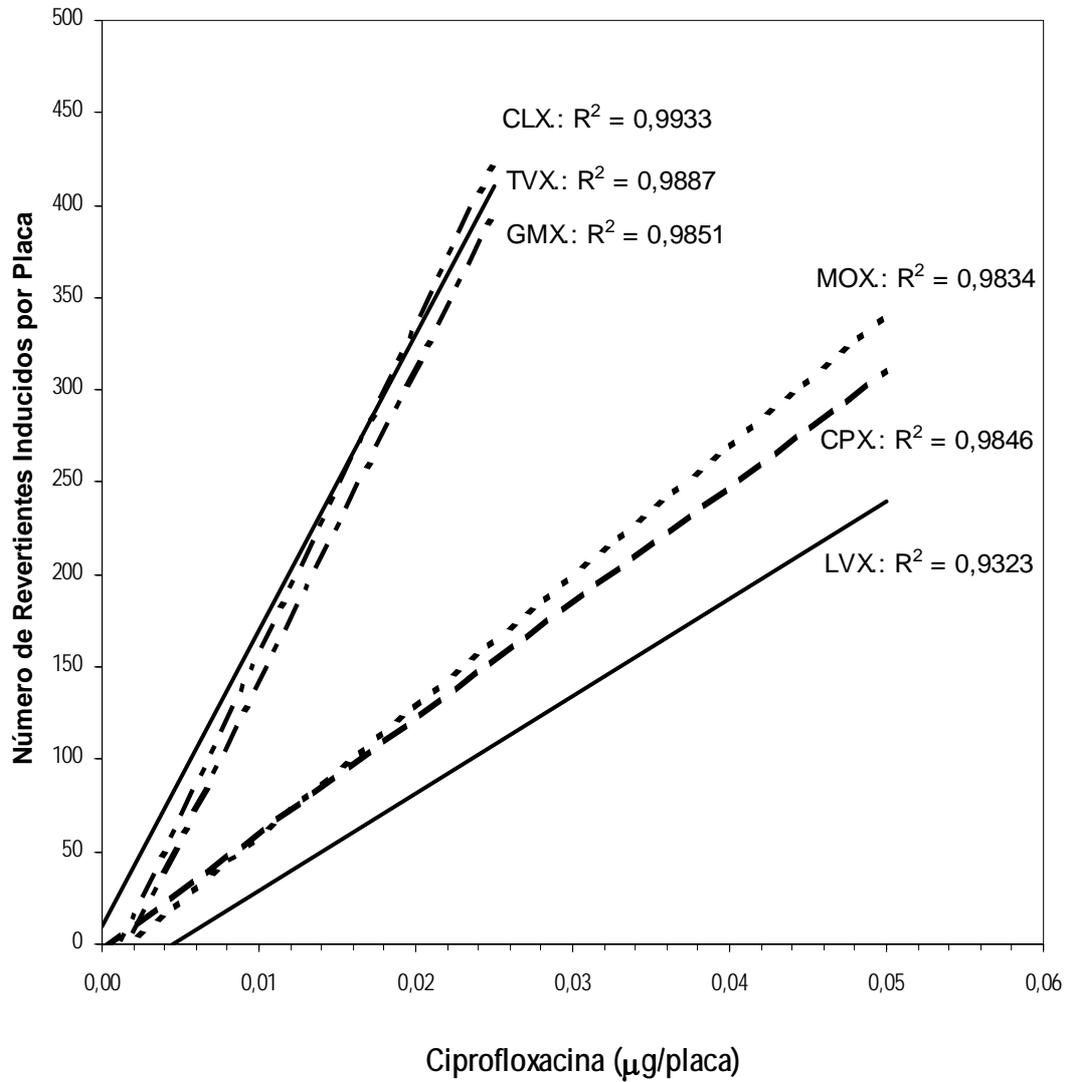
**Tabla 20.-** Mutagénesis producida por seis quinolonas en la cepa de *S. enterica* Serov. Typhimurium TA102.

QUINOLONA		NÚMERO DE REVERTIENTES POR PLACA							
		Concentración de Ciprofloxacina ( $\mu\text{g/placa}$ )							
		0	0,00325	0,00612	0,0125	0,025	0,05	0,1	
CPX	Media	212,4	240,43	256,63	269,5	346,84	535,17	T	
	RI	0	28,03	44,23	57,1	134,44	322,77		
	IM	1	1,13	1,21	1,27	1,63	2,52		
CLX	Media	229,18	280,49	357,32	439,67	635,28	T	T	
	RI	0	51,31	128,14	210,48	406,1			
	IM	1	1,22	1,56	1,92	2,77			
GMX	Media	228,98	251,25	287,78	391,63	639,84	883,78	799,13	
	RI	0	22,28	58,80	162,65	410,86	654,8	570,15	
	IM	1	1,10	1,26	1,71	2,79	3,86	3,49	
LVX	Media	228,98	230,50	165,25	271,48	289,13	493,53	T	
	RI	0	1,53	-63,73	42,5	60,15	264,55		
	IM	1	1,01	0,72	1,19	1,26	2,16		
MOX	Media	229,18	244,44	251,78	309,83	361,66	585,03	740,83	
	RI	0	15,26	22,60	80,65	132,48	355,85	511,65	
	IM	1	1,07	1,10	1,35	1,58	2,55	3,23	
TVX	Media	270,60	287,15	367,0	451,38	704,98	596,67	539,22	
	RI	0	16,55	96,4	180,78	434,38	326,07	268,62	
	IM	1	1,06	1,36	1,67	2,61	2,20	1,99	

T = toxicidad



**Figura 26.-** Relación dosis respuesta inducida por Ciprofloxacin (CPX), Clinafloxacin (CLX), Gemifloxacin (GMX), Levofloxacin (LVX), Moxifloxacin (MOX) y Trovafloxacin (TRV) en *E. coli* WP2/pKM101 (IC186).



**Figura 27.-** Relación dosis respuesta inducida por Ciprofloxacin (CPX), Clinafloxacin (CLX), Gemifloxacin (GMX), Levofloxacin (LVX), Moxifloxacin (MOX) y Trovafloxacin (TRV) en *S. enterica* Typhimurium TA102.

**Tabla 21.-** Potencia mutagénica de cada quinolona en *E. coli* WP2 (IC186) y *S. enterica* Typhimurium (TA102).

Potencia Mutagénica <sup>1</sup>		
QUINOLONA	<i>E. coli</i> WP2 / pKM101 (IC186)	<i>S. enterica</i> Serov. Typhimurium (TA102)
CPX	5423	6279
LVX	3401	5279
MOX	3360	7071
CLX	7070	16034
GMX	5689	16884
TVX	6060	17742

<sup>1</sup>Número de revertientes inducidos por µg de quinolona por placa

**Tabla 22.-** Relación entre la CMI y la dosis máxima mutagénica (MMD) de cada quinolona en *E. coli* WP2 (IC186) y *S. enterica* Typhimurium (TA102).

QUINOLONA	<i>E. coli</i> WP2 / pKM101 (IC186)			<i>S. enterica</i> Typhimurium (TA102)		
	CMI (µg/ml)	MMD (µg/ml)	CMI/MMD	CMI (µg/ml)	MMD (µg/ml)	CMI/MMD
CPX	0,125	0,000625	200	0,250	0,00250	100
LVX	0,250	0,000625	400	0,125	0,00250	50
MOX	0,250	0,001250	200	0,125	0,00250	50
CLX	0,060	0,000625	96	0,060	0,00125	48
GMX	0,060	0,000625	96	0,060	0,00125	48
TVX	0,125	0,000625	200	0,060	0,00125	48

MMD, Concentración no tóxica a la que se obtiene el máximo número de revertientes por placa.

## *V.- DISCUSIÓN*

En la actualidad, las quinolonas están siendo empleadas ampliamente en la terapia antimicrobiana, no obstante, y a pesar de los numerosos estudios que se han realizado, el estudio de sus mecanismos de acción así como el efecto que producen en las células bacterianas, continúan siendo áreas de gran interés, dado que todavía existen muchos interrogantes. En este marco, los trabajos que se presentan en esta memoria están dirigidos a profundizar en los mecanismos de mutagénesis de esta familia de antibacterianos y en determinar el potencial mutagénico de quinolonas de uso actual en clínica.

### 1.- REQUERIMIENTOS GENÉTICOS EN LA MUTAGÉNESIS POR CIPROFLOXACINA

No resulta contradictorio cuando se afirma que las quinolonas tienen la particularidad de presentar una escasa o nula actividad mutagénica, tanto en *E. coli* como en *S. enterica* Typhimurium; por lo que en los diversos ensayos bacterianos para detectar su mutagénesis, es imprescindible que las cepas cuenten con ciertos requerimientos genéticos mínimos; caso contrario, la carencia de expresión de determinados genes no promovería completamente la aparición de mutagenésis (Piddock y Walters, 1992; Slezarikova, *et al.* 1992; Clerch, 1996a; Clerch, 1996b; Zhao y Drlica, 2002).

Relativo a este aspecto, queda de manifiesto la importancia de que las cepas empleadas de *S. enterica* Serov. Typhimurium y *E. coli* WP2 portadoras de pares de bases AT en la diana mutacional *hisG428* y *trpE65* respectivamente, deban presentar el operon *mucAB*, ya sea a través de los plásmidos pUA199 o pKM101 (Hartman, *et al.* 1986; Piddock y Wise, 1987; Slezarikova, *et al.* 1992; Clerch, 1995). Ello es debido a que este operón codifica la DNA Pol RI, la cual es una DNA polimerasa propensa al error ante la aparición de ciertas lesiones inducidas por ciprofloxacina, mientras que en su ausencia se suprimen tales efectos (Clerch, 1992; Clerch, 1995; Clerch, *et al.* 1996a; 1996b). En cuanto a la inherente presencia del operon homólogo *umuDC* en estas cepas, bien documentado está que no condiciona esta mutagénesis; la cual es atribuida a cualquiera de las hipótesis señaladas anteriormente en la parte introductoria (Clerch, 1996a; 1996b).

Todo ello indica que el principal mecanismo de mutagénesis por quinolonas es dependiente de los genes *mucAB* y/o posiblemente a la participación de otras polimerasas propensas al error, vía respuesta SOS (Levin, *et al.* 1991).

Recientemente, el descubrimiento de que los mutantes  $\Delta uvrB$  de *S. enterica* Typhimurium que presentan dicha mutación como consecuencia de una delección que contiene más genes que el propio *uvrB*, ha cuestionado seriamente de que el sistema NER sea requerido para que las quinolonas sean mutagénicas. De entre los diversos genes deleccionados, se ha sugerido que los asociados a la biosíntesis de molibdeno (*moaA*, *moaB*, *moaC*, *moaD*, *moaE*) podrían modular la mutagénesis de algunos compuestos como HAP y AHAP (Rosentel, *et al.* 1995; Joshi, *et al.* 1996; Anderson, *et al.* 2000 ; Kozmin, *et al.* 2000). Los resultados obtenidos en este trabajo, sobre cepas (TA2659 y TA104) que presentan la menor pérdida en la región  $\Delta uvrB$  (equivalente a 14 Kb, 0,3% de su genoma) indican claramente que estos genes no intervienen en la mutagénesis mediada por quinolonas. Así, no se observa un aumento significativo en el número de revertientes por placa al complementar con la región que contiene los genes *moa* (Tabla 11). Evidentemente, ello no excluye la participación de dichos genes en procesos de detoxificación de análogos de bases como HAP y AHAP que dan lugar a intermediarios activos para la actividad mutagénica (Rosentel, *et al.* 1995; Anderson, *et al.* 2000; Kozmin, *et al.* 2000).

Aún así, creemos que este tipo de anomalías genómicas en estas cepas de ensayo de retromutación, no le restan validez al sistema para los trabajos futuros o los obtenidos en los pasados treinta años, bajo la cual se han tomado muchas decisiones reguladoras. Esto es debido principalmente, porque el valor predictivo de estos ensayos es corroborado por otros sistemas. Sin embargo, para compuestos individuales o grupos químicos específicos a objeto de tener la certeza de su actividad, la delección de otros genes diferentes al *uvrB* pueden tener trascendencia. Frente a ello, se debe también considerar la posibilidad de que otros genes deleccionados con función desconocida, como los tres localizados entre STM 1490-1492, todos ellos hipotéticos genes involucrados en el transporte de la cepa TA104 (Porwollik, *et al.* 2001), podrían de una u otra manera estar participando en

el transporte de determinados compuestos químicos y repercutiendo en la mutagénesis.

Por otra parte, y con respecto a la necesidad de que las bacterias presenten un sistema funcional íntegro en el proceso NER, los resultados obtenidos en este trabajo con el gen *uvrB*, permiten afirmar que efectivamente se requiere la actividad de dicho gen para la manifestación de mutagénesis por quinolonas, ya que al complementar el gen *uvrB* en cepas de *S. enterica* Typhimurium que lo presentan delecionado, se aprecia un aumento de la mutagénesis mediada por ciprofloxacina (Tabla 12).

Los primeros resultados sobre la mutagénesis producidos por estos compuestos ya mostraron que las quinolonas no inducían mutagénesis en cepas mutantes  $\Delta uv r B$  (Inman, *et al.* 1983; Maron y Ames, 1983), aduciéndose en su momento que las dianas ensayadas no eran las apropiadas para la detección mutagénica. Mas adelante, en el estudio del ácido nalidíxico, ciprofloxacina, ofloxacina y enoxacina se demostró la utilidad de cepas portadoras del blanco mutacional *hisG428* que presentaban intacto el gen *uvrB*; por lo que se infirió que la mutagénesis no podía solo deberse al tipo de diana mutacional, sino a la integridad del sistema NER (Ysern, *et al.* 1990). Similarmente, los trabajos de Gocke también habían demostrado la posible implicación de la endonucleasa UvrABC en mutagénesis al estudiar la retromutación de las cepas TA104 y TA2638 (cepa isogénica a TA104, pero *uvrB*<sup>+</sup>) durante tratamientos con fleroxacina y ácido oxolínico. Asimismo, la obtención de resultados positivos para la fleroxacina ante una diana mutacional *hisD3052* en una cepa Uvr<sup>+</sup> reforzó dicha hipótesis; aunque se planteó el papel del complejo UvrABC en la generación de mutagénesis por parte de estos compuestos (Gocke, 1991).

Resultados similares se han obtenido en el sistema *E. coli* WP2, el cual presenta pares de bases TA en el *hot spot trpE65* (Blanco, *et al.* 1993; Blanco *et al.* 1998a, 1998b; Blanco *et al.* 1999). En él se evidencia altos índices de mutagénesis en las cepas que presentan intacto el sistema NER y que contiene los genes *mucAB* (cepa IC186), mientras que es perceptible la disminución de la

mutagénesis en la cepa isogénica pero deficiente en el sistema NER por la mutación *uvrA* (Tabla 13 y Figura 24).

Este conjunto de resultados demuestra que en esta mutagénesis son necesarias las actividades de los genes *uvrB* y *uvrA*, aunque ello no signifique necesariamente que obedezca al sistema convencional del proceso NER, dado los estudios actuales en la remoción de ciertos aductos. Así por ejemplo, con mitomicina C que exhibe un amplio espectro mutacional, es necesaria la proteína UvrB en la manifestación de su mutagénesis. Dicha proteína muestra una actividad desacoplada frente a UvrA y UvrC, lo cual se debe posiblemente a que ciertos aductos originan una flexión del DNA, permitiendo el reconocimiento directo de UvrB y prescindiendo de UvrA para la localización de lesiones; mientras que en las incisiones alrededor de las lesiones, se postula que posiblemente participe la proteína Cho (Lage, *et al.* 2003).

Dado que la actividad mutagénica de la ciprofloxacina es dependiente de la actividad UvrAB y posiblemente de UvrABC, tanto en *S. enterica* Typhimurium como en *E. coli* WP2; se propone que la mutagénesis por ciprofloxacina, o por lo menos parte de ella se origine como consecuencia del establecimiento de lesiones premutagénicas, las cuales serían una consecuencia de la interacción estable de las quinolonas con el complejo DNA – DNA girasa. Complementario a ello, conviene destacar los antecedentes sobre la ruptura del DNA por parte de la DNA girasa; en el cual, los extremos 5' forman un enlace transitorio con las Tyr<sup>122</sup> de cada subunidad GyrA (Shen, *et al.* 1989; Shen 1993). Ello permitiría comportarse como un entrecruzamiento intercatenario y ser sustrato de la escinucleasa UvrABC.

El modo en que operaría UvrABC sería estableciendo una incisión bimodal en una de las hebras conteniendo la lesión, aunque el oligonucleótido seguirá unido a su hebra complementaria, proporcionando un segmento de ssDNA premutagénico conteniendo aún la lesión. Este segmento es subsecuentemente polimerizado, e involucra la síntesis de translesión a través de la lesión remanente, conduciendo a una posible mutación por parte de polimerasas propensas al error. En una segunda rueda de participación de UvrABC, eliminaría de modo convencional la lesión original (Cohen y Livneh; 1992; Cohen y Livneh, 1994; Eisenstadt, *et al.* 1989;

Svoboda, *et al.* 1993; Dronkert y Kanaar, 2001). Probablemente en todo ello se requiera la participación de un conjunto de moléculas como la DNA Pol RI, ciertas subunidades de la DNA Pol III, RecA, Ssb, la propia holoenzima DNA Pol III y otras.

Esta propuesta es consecuencia de la similitud en la respuesta del fármaco respecto a la actividad mutagénica de otros compuestos químicos y agentes físicos ya conocidos. Así por ejemplo, se señala la hipótesis de la incisión por parte de UvrABC, que es necesaria en la mutagénesis inducida por entrecruzamientos intercatenarios dados por psoraleno, mitomicina C, derivados del platino y otros (Dronker and Kanaar, 2001). Según Igall, observa que el 8-metoxipsoraleno produce revertientes al triptófano en células Uvr<sup>+</sup>, pero no en células Uvr<sup>-</sup> de *E. coli*; aunque Yatagai y col, también detectan mutaciones en células Uvr<sup>-</sup> tratadas con 8-metoxipsoraleno, pero no debidos a entrecruzamientos en el DNA (Slader, *et al.* 1989). Investigaciones similares, igualmente han establecido que el 8-metoxipsoraleno induce mutaciones en células Uvr<sup>-</sup>, pero cuando las células son reirradiadas con UV que convierte los monoadductos en entrecruzamientos, la producción de ciertas mutaciones decrece, al igual que la supervivencia; concluyéndose en estas investigaciones, que la aparición de entrecruzamientos son letales pero no mutagénicas (Slader, *et al.* 1989). Debe de precisarse que esta conclusión es sólo aparente, ya que los entrecruzamientos son mutagénicos pero solo en células Uvr<sup>+</sup>. De modo similar sucede con mitomicina C, ya que se ha demostrado su actividad mutagénica en presencia de los genes *mucAB* y bajo un sistema NER funcional, tanto en *E. coli* como en *S. enterica* Typhimurium (Ramos *et al.* 1998).

Otro caso interesante resulta en la mutagénesis por UV, que trabaja sobre la hipótesis de que la escinucleasa UvrABC opera sobre dos lesiones cercanas y opuestas, y que la mutagénesis se inicia por creación de un segmento de ssDNA, que es subsecuentemente completado por un paso de polimerización mutagénica (Cohen y Livneh, 1984; Kunz y Glickman, 1984).

Los datos sobre el papel *in vivo* del sistema NER, son aún poco concluyentes; aunque estructuras que implica entrecruzamientos intercatenarios y dos lesiones cercanas y opuestas (o lesiones opuestas no adyacentes) ha resultado

atractiva; porque provee un modelo para un mecanismo por el cual, la reparación por escisión que es usualmente considerada como libre de error, puede conducir a la generación de un sitio premutagénico. La propuesta no es excluyente; ya que parte de las lesiones pueden ser letales o bien reparadas por procesos libre de error, como el de la recombinación homóloga con la participación de la DNA Pol I, RecA y posiblemente otras proteínas como RecB, C, D, F, G, O, R, cuyos mutantes son sensibles a los enlaces intercatenarios (Kuzminov, 1999; Dronker y Kanaar, 2001).

Modelos propuestos sobre viabilidad celular y mutagénesis en células *uvr* (Murray, 1979) sostienen que el aumento de la letalidad y la disminución de la mutagénesis se deben a enlaces intercatenarios. Estas lesiones serían intrínsecamente letales, pero pueden comportarse como lesiones premutagénicas ante un sistema *Uvr*<sup>+</sup>. Sin embargo, es interesante apreciar en los resultados obtenidos en este trabajo que no existe una acentuada diferencia en el grado de sensibilidad a la ciprofloxacina entre las cepas portadoras en la  $\Delta$ *uvrB* y las cepas *uvrB*<sup>+</sup> (Tabla 12). Resultados similares frente a otros de supervivencia, ha llevado a sugerir que la escinucleasa *UvrABC* no participa de modo muy activo en el procesamiento de lesiones inducidas por ciprofloxacina, probablemente debido a que este tipo de lesiones se producen en menor cuantía (Clerch, 1995). No obstante, los resultados obtenidos en *E. coli uvrA*<sup>-</sup> y *uvrA*<sup>+</sup> (Tabla 13, Figura 24) muestra que la cepa deficiente en *uvrA* (IC188) resulta ser más sensible, lo que sugiere que este tipo de lesiones deben ser más frecuentes de lo esperado.

## 2.- LESIONES OXIDATIVAS POR CIPROFLOXACINA

Otro tipo de daño atribuido a determinadas quinolonas es el daño oxidativo. Estudios de fototoxicidad sostienen que las lesiones de tipo oxidativo que se generan por ciprofloxacina, se producen a través de dos distintos mecanismos, Tipo I y Tipo II (Kawanishi, *et al.* 2001). El primero de ellos involucra la transferencia de electrones a ciertas bases nitrogenadas del DNA, particularmente a la guanina por tener el más bajo potencial de oxidación, esta transferencia induciría la formación de 8-oxodG causando transversiones. Kawanishi y col. han establecido que el ácido

nalidíxico más UVA causa daño al DNA en guaninas de secuencias -GG- a través de la transferencia electrónica. En cambio, el mecanismo Tipo II involucra la transferencia de energía de una molécula fotosensible al oxígeno molecular para producir oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), el cual tiene una relativa larga vida media, ocasionando lesiones en el DNA. Este tipo de lesión se ha relacionado con las fluoroquinolonas que muestran ser fotocarcinógenos más potentes que el ácido nalidíxico, sugiriéndose que especialmente producen  $^1\text{O}_2$ . Asimismo, recientemente se ha mostrado que la lomefloxacin causa lesiones específicamente sobre guaninas a través de la generación de  $^1\text{O}_2$ . Todo ello sugiere que en función de la molécula concreta de quinolona y de la longitud de onda a la cual se exponen pueden generar diferentes EROs y ser por tanto agentes oxidativos (Umezawa, *et al.* 1997; Bulera, *et al.* 1999; Gocke, 2001; Kawanishi, *et al.* 2001).

En cualquier caso y dado que son recientes los trabajos sobre el efecto de las quinolonas y la generación de lesiones oxidativas, no se conoce si una quinolona de amplio uso como la ciprofloxacina podría dar lugar a formas EROs, dado que la mayoría de estudios se han centrado en las quinolonas fotocarcinógenas.

Para elucidar si la mutagénesis por ciprofloxacina podría generar formas EROs y, por tanto, introducir lesiones oxidativas en el DNA, se ha utilizado la estrategia del empleo de cepas defectivas en la respuesta regulada por OxyR y SoxRS. Ambos regulones responden al peróxido de hidrógeno y al anión superóxido respectivamente. Igualmente, y dado que la generación de lesiones 8-oxoG por las formas EROs producidos por algunas quinolonas parecen ser un tipo de lesión atribuido a estos compuestos, se determinó también la mutagénesis producida por la ciprofloxacina en cepas *mutM* y *mutY*, las cuales son defectivas en las glicosilasas que intervienen en la eliminación de estos errores.

Los resultados obtenidos indican que la ciprofloxacina no debe generar peróxido de hidrógeno, dado que no se observa un aumento de la mutagénesis en una cepa  $\Delta\text{oxyR}$  (Tabla 14 y 15); sin embargo, debe de generar el anión superóxido ( $\text{O}_2^{-2}$ ), ya que la mutagénesis aumenta claramente en una cepa *soxRS* (Tabla 16 y Figura 25). Además, y según puede observarse en las Tablas 17 y 18, las lesiones

oxidativas que se introducen no deben ser de 8-oxoG, dado que las cepas MutM<sup>-</sup> y MutY<sup>-</sup> no arrojaron índices de mutagénesis mayores a la de sus cepas isogénicas no mutantes en estas glicosilasas.

El conjunto de estos resultados indica que la ciprofloxacina debe de ser un débil agente oxidativo, capaz de generar lesiones oxidativas diferentes de 8-oxoG, probablemente a través del mecanismo tipo II comentado anteriormente, por la formación de O<sub>2</sub><sup>-2</sup> y/o oxígeno singlete. Es de señalar que en este trabajo, la ciprofloxacina no ha sido sometida a ningún tipo de radiación, por lo que no puede descartarse que su potencial oxidativo aumente tras irradiar con UVA, al igual que lo descrito para otros compuestos de esta familia de antimicrobianos (Bulera, *et al.* 1999).

### 3.- POTENCIAL MUTAGÉNICO DE QUINOLONAS

El tercer objetivo de este trabajo, ha consistido en estudiar el potencial mutagénico en bacterias de algunas quinolonas utilizadas actualmente en medicina humana. Para ello, se escogieron moléculas de diferentes generaciones y de uso actual en clínica y, se estudió la mutagénesis que producían en *E. coli* WP2/pKM101 y *S. enterica* Typhimurium TA102. Ambas cepas son portadoras de los genes *mucAB* y poseen un sistema NER funcional. Los resultados obtenidos mostraron que presentan una sensibilidad diferente a estos compuestos. Así, el número de revertientes inducidos por placa es mayor en la cepa TA102 que en IC186 (Tabla 21). Esta sensibilidad diferencial responde probablemente a las características de cada cepa, ya que a pesar de que ambas presentan dianas mutacionales similares y contienen el operon *mucAB* en el plásmido pKM101, existen otras características que las hace distintas y que podrían de alguna manera modular dicha respuesta. En este sentido, la cepa IC186 es silvestre para la permeabilidad, mientras que TA102 es *rfa1027*, habiéndose demostrado que esta mutación confiere una mayor sensibilidad a las fluoroquinolonas (Clerch, 1991; De Marini, *et al.* 2000). Por otro lado, ambas presentan un número de blancos mutacionales distintos. La cepa TA102 contiene la diana mutacional en el plásmido multicopia pAQ1 (Albertini y Gocke, 1988), mientras que en IC186 se halla en el

cromosoma. Además, debe considerarse la inherente configuración topológica que adoptaría el DNA conteniendo las dianas mutacionales para cada cepa.

A pesar de esta sensibilidad diferencial, es de destacar que en ambos sistemas de ensayo las quinolonas se separan en dos grupos, en función del grado de mutagénesis que producen. Así, clinafloxacin, trovafloxacin y gemifloxacin son las más mutagénicas, mientras que levofloxacin y moxifloxacin son claramente menos mutagénicas en ambos sistemas de ensayo. Estas quinolonas que producen una mayor mutagénesis, presentan en común que son miembros de la cuarta generación de esta familia de quimioterápicos, mostrando clinafloxacin y gemifloxacin en *E. coli* WP2 y clinafloxacin, gemifloxacin y trovafloxacin en *S. enterica* Serov. Typhimurium, los menores valores de CMI, lo cual indica su mayor poder antibacteriano. En cambio, ciprofloxacina pertenece al grupo de las menos mutagénicas en *S. enterica* Typhimurium, mientras que es detectada como más mutagénica en *E. coli*.

Hay muy pocos estudios sobre la relación entre la estructura molecular y mutagénesis. Únicamente se ha relacionado la presencia de un grupo metoxi en posición C-8 en la molécula de moxifloxacin con su capacidad para disminuir la selección de mutantes resistentes a quinolonas en *Mycobacterium bovis* y conferir reducidos efectos de fotogenotoxicidad y clastogenicidad (Chételat, *et al.* 1996). En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo corroboran que esta molécula tiene un bajo potencial mutagénico.

El hecho de que las quinolonas sean moléculas mutagénicas, plantea evidentemente serios problemas para su uso sistemático en el tratamiento de enfermedades infecciosas, dado que podrían generar mutaciones en las poblaciones de patógenos y ser una de las causas de que dichos patógenos presenten una mayor virulencia. En este sentido está apareciendo recientemente en la literatura nuevos conceptos como “concentración de prevención de mutantes”, “ventana de selección de mutantes” (Blondeau, *et al.* 2001; Zhao y Drlica, 2002). Estos conceptos derivan de estudios *in vitro* de selección de mutantes resistentes a una quinolona dada, al tratar un patógeno con concentraciones crecientes de dicha molécula y, en la mayoría de los casos se utilizaron dosis de selección elevadas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran que las quinolonas son mutagénicas a dosis muy inferiores a la CMI que presentan las cepas de ensayo para cada quinolona. Parece lógico pues, que si durante el tratamiento clínico con un compuesto de esta familia no se alcanza en determinados órganos, tejidos u alguna otra estructura, una dosis elevada y constante en el tiempo, la quinolona puede introducir mutaciones en el patógeno y como consecuencia de ello incrementar la variabilidad genética, posibilitando de esta manera la emergencia de nuevos fenotipos ante cualquier presión selectiva. Este efecto de las quinolonas que se propone, será posible sólo si el patógeno posee un sistema NER funcional y una(s) polimerasa(s) tendente(s) al error, tipo MucAB. Con el estado actual del conocimiento, ambos requerimientos pueden darse en las especies de patógenos Gram negativos, y también posiblemente de Gram positivas. Así, se ha descrito que patógenos como *M. tuberculosis*, posee elementos reguladores para un sistema SOS funcional; y contiene además, todos los elementos asociados con la mutagénesis SOS, con la excepción de genes *polB* y *umuD* (Mizrahi and Anderson, 1998). Del mismo modo, *M. smegmatis* presenta elementos reguladores clave para un sistema funcional de inducción SOS (Durbach, *et al.* 1997). Por otro lado, aunque la reparación mutagénica esta ausente en *S. pneumoniae* (Gasc, *et.al.* 1980), se ha descrito un operon del transposon conjugativo Tn5252 que confiere una reparación mutagénica inducida por UV en el neumococo y *E. faecalis* (Muñoz-Najar y Vijayakumar, 1999).

La actividad mutagénica de las quinolonas a dosis subletales demostrado en este trabajo, debe diferenciarse de la que produce concentraciones elevadas de estos compuestos. En este sentido y como se ha comentado en la introducción de esta memoria, el tratamiento a dosis superiores a la CMI provoca mutaciones independientes del crecimiento (o adaptativas), las cuales se localizan en las dianas de las quinolonas y generan en las bacterias resistencia a estos antimicrobianos. Por el contrario, las mutaciones debidas al tratamiento con dosis inferiores a la CMI son mutaciones dependientes del crecimiento que se pueden producir en cualquier punto del genoma. Relacionado con esto, recientemente se ha descrito para *Mycobacterium smegmatis*, que bajas concentraciones de quinolonas pueden producir mutaciones en loci distintos a *gyrA* y que más de la mitad de los mutantes

recuperados fueron además resistentes a múltiples drogas; pero cuando la concentración de quinolonas fue incrementada, la mayor parte de mutantes acarreaban mutaciones en *gyrA* (Zhou, *et.al.* 2000). Asimismo, *in vitro* también se han aislado mutantes conteniendo mutaciones ajenas a la topoisomerasa en *Streptococcus pneumoniae*, obtenidos con tratamientos a bajas concentraciones de quinolonas (Pan, *et al.* 1996).

En función de los resultados presentados en esta memoria y de las consecuencias que puede tener la exposición de las poblaciones de patógenos a bajas dosis de quinolonas, la determinación del potencial mutagénico de nuevas moléculas de esta familia a través de ensayos como los realizados en este trabajo, debe ser un parámetro a considerar en el desarrollo de nuevas moléculas con una mayor actividad antimicrobiana.

## *VI.- CONCLUSIONES*

---

## CONCLUSIONES

1.- El operon *moa* involucrado en la biosíntesis de cofactores de molibdeno, próximo a la región *uvrB* delecionada en diferentes cepas de *S. enterica* Serov. Typhimurium, no participa en la mutagénesis promovida por ciprofloxacina; aunque es posible que existan otros genes que modulen dicha mutagénesis.

2.- Las proteínas UvrB y UvrA del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) son necesarias para la manifestación de mutagénesis por ciprofloxacina. Dichas proteínas participarían en el procesamiento de ciertas lesiones premutagénicas, producto del complejo estable que se formaría entre DNA – DNA girasa – quinolona; generándose una lesión mutagénica sobre la que actuaría alguna DNA polimerasa tendente al error, como MucAB.

3.- La mayor sensibilidad del mutante SoxRS en la mutagénesis mediada por ciprofloxacina indica que el fármaco es capaz de generar especies reactivas de oxígeno, probablemente aniones superóxido ( $O_2^{-2}$ ) u oxígeno singlete; mientras que no debe de producirse peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), dado que no se detectan diferencias en mutagénesis entre las cepas OxyR<sup>+</sup> y OxyR<sup>-</sup>.

4.- La ciprofloxacina no introduce mayoritariamente lesiones oxidativas del tipo 8-oxoguaninas, dado que no se observa un aumento en el número de revertientes en cepas defectivas en MutY y MutM, respecto a sus respectivas cepas silvestres isogénicas.

5.- En la determinación de la potencia mutagénica de las diversas quinolonas ensayadas, la cepa *S. enterica* Serov. Typhimurium TA102 presenta una mayor sensibilidad que la cepa *E. coli* WP2 (IC186).

6.- Las quinolonas que mostraron una mayor actividad mutagénica en los dos sistemas de ensayos fueron la clinafloxacina, gemifloxacina y trovafloxacina, todas ellas representativas de las quinolonas de cuarta generación.

7.- Levofloxacina y moxifloxacina son las quinolonas que presentan la menor potencia mutagénica; de ellas, esta última presenta un grupo metoxi en posición C-8, el cual se ha asociado con una menor capacidad mutagénica de dicha molécula.

**8.-** La ciprofloxacina presenta un elevado potencial mutagénico en *S. enterica* Typhimurium, mientras que su capacidad mutagénica en *E. coli* WP2 es baja. Estos resultados indican que además de las características químicas de cada molécula, las diferencias existentes entre las especies bacterianas, probablemente a nivel de permeabilidad o de acumulación, juegan un papel determinante en la potencia mutagénica de las quinolonas.

**9.-** Se propone el uso combinado de los ensayos de retromutación en *E. coli* WP2 y *S. enterica* Typhimurium en el screening primario de nuevas moléculas de quinolonas con el objetivo de descartar en las siguientes fases aquellas moléculas que presenten un elevado potencial mutagénico.

**10.-** Esta familia de antibacterianos es capaz de producir mutaciones en bacterias a dosis inferiores a su CMI, siempre y cuando las bacterias posean un sistema NER funcional y una DNA polimerasa tendente al error, tipo MucAB. Esta actividad mutagénica puede producir un aumento de la variabilidad genética de las poblaciones de patógenos y ser una de las causas de la emergencia de patógenos con una mayor virulencia.

*VII.- REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abril, N.; Jurado, J.; Luque-Romero, F.; Prieto-Alamo, J. y C. Pueyo,** 1999. Evaluación Mutagénica en Bacterias: El Ensayo Ara de mutaciones directas. *En De la Peña, E.; Bourguete, I.; Guadaño, A.; pp. 15-35, en Evaluación Mutagénica y Genotóxica. Edit. Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación. Ministerio de Educación y Cultura. Murcia.*
- Albertini, S. and E Gocke.** 1988. Plasmid Copy Number and Mutant frequencies in *S. typhimurium* TA102. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 12 : 353-363.
- Aleixandre, V.; Herrera, G.; Urios, A. and M. Blanco.** 1991. Effects of Ciprofloxacin on Plasmid DNA Supercoiling of *Escherichia coli* Topoisomerase I Gyrase Mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Jun. Vol.35, N°1 : 20-23.*
- Altuvia, S.; Weinstein-Fischer, D.; Zhang, A.; Postow, L. and G. Storz.** 1997. A Small, Stable RNA Induced by Oxidative Stress : Role as a Pleiotropic Regulator and Antimutator. *Cell. Vol. 90 : 43-53.*
- Ames, B. and D. Levin.** 1986. Classifying mutagens as to their specificity in causing the six possible transitions and transversions a simple analysis using the Salmonella mutagenicity assay. *Environ. Mutagen.* 8 (1) : 9 – 28.
- Anderson L.; McNairn, E.; Leubke, T.; Pau, R. and D. Boxer.** 2000. ModE-Depend Molybdate Regulation of the Molybdenum Cofactor Operon *moa* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology. Dec.: 7034-7043.*
- Asad, M.; Medeiros, D.; Felzenszwalb, I.; Laitao, A. and N. Asad.** 2000. Participation of stress-inducible systems and enzymes involved in BER and NER in the protection of *Escherichia coli* against cumene hydroperoxide. *Mutation Research.* 461 : 31-40.
- Asad, M.; Medeiros, D.; Felzenszwalb, I.; Laitao, A. and N. Asad.** 2001. Effects of low iron conditions on the repair of DNA lesions induced by Cumene hydroperoxide in *Escherichia coli* cells. *Mutation Research.* 485 : 339-344.
- Ataya, F.** 2001. Análisis Molecular de la Proteína Portadora del cofactor de Molibdeno de *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Bacher, N.; Arad, G.; Maor-Shoshani, A. and Z. Livneh.** 1999. The Mutagenesis Protein UmuC is a DNA Polymerase Activated by UmuD', RecA, and SSB and is Specialized for Translesion Replication. *Journal of Biological Chemistry. Vol.274, N°45 : 31763-31766.*
- Beardem D. and I. Danzinger.** 2001. Mechanism of Action of and Resistance to Quinolones. *Pharmacotherapy, Oct.21: 224S-232S.*
- Becherel, O. and R. Fuchs.** 1999. SOS Mutagenesis Results from Up-Regulation of Translesion Synthesis. *J. Mol. Biol.* 294 : 299-306.
- Bjedov, I.; Tenailon, O.; Gerard, B.; Denamur, E.; Taddei, F. and I. Matic.** 2003. Stress Induced Mutagenesis in Bacterial. *Science. May 30; 300(5624): 1404-1409.*

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Blanco, M.; Herrera, G. y A. Urios.** 1993. Increased mutability by oxidative stress in OxyR-deficient *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cells : clonal occurrence of the mutants during growth on nonselective media. *Mutation Research.* 346(4) : 215–220.

**Blanco, M.; Martinez, A.; Urios, A.; Herrera, G. and J. O'Connor.** 1998a. Detection of oxidative mutagenesis by isoniazid and other hydrazine derivatives in *Escherichia coli* WP2 tester strain IC203, deficient in OxyR: strong protective effects of rat liver S9. *Mutation Research.* 417 : 39-46.

**Blanco, M.; Urios, A. and A. Martinez.** 1998b. New *Escherichia coli* WP2 tester strains highly sensitive to reversion by oxidative mutagens. *Mutation Research.* 16, 413(2) : 95–101.

**Blanco, M.; Urios, A. y A. Martinez.** 1999. Detección de mutaciones inducidas por estrés oxidativo mediante IC203, una nueva cepa de ensayo derivada de *Escherichia coli* WP2 uvrA/pKM101 y deficiente en la función OxyR. En De la Peña, E.; Bourguete, I.; Guadaño, A.; pp. 37-43, en *Evaluación Mutagénica y Genotóxica.* Edit. Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación. Ministerio de Educación y Cultura.

**Blondeau, J.M.; Zhao, G. Hansen and Drlica.** 2001. Mutant prevention concentration of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemother.* 45 : 433-438.

**Boudsoe, F.; Ling, H.; Yang, W. and R. Woodgate.** 2002. Structure-based interpretation of missense mutations in Y-family DNA polymerase and their implications for polymerase function and lesion bypass. *DNA Repair* 1: 343-358.

**Bradley, T. and G. Walker.** 1998. Mutagenesis and More : *umuDC* and the *Escherichia coli* SOS Response. *Genetics.* 148 : 1599–1610.

**Bredberg, A.; Brant, M.; Riesbeck, K.; Azou, Y. and A. Forsgren.** 1989. 4-Quinolones antibiotics: positive genotoxic screening test despite an apparent lack of mutation induction. *Mutation Research.* 211 : 171-180.

**Bulera, S.; Theiss, J.; Festerling, T. and A. Iglesia.** 1999. *In Vitro* Photogenotoxicity Activity of Clinafloxacin: A Paradigm Predicting Photocarcinogenicity. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 156 : 220-230.

**Cabiscol, E.; Tamarit, J. and J. Ros.** 2000. Oxidative stress in bacterial and protein damage by reactive oxygen species. *Internatl. Microbiol.* 3: 3–8.

**Cadet, J.; Boudat, A.; D'Han, C.; Duarte, V.; Gasparutto, D.; Romieu, A. and J. Ravanat.** 2000. Oxidative base damage to DNA : specificity of base excision repair enzymes. *Mutation Research.* 462 : 121-128.

**Castro, D.; Ruiz, J.; Santamaria, J.; Vila, J. y J. Borego.** 1997. Mecanismos de Resistencia Quinolonas en cepas de *Salmonella typhimurium* strains. *Ars. Pharmaceutica.* N°38, 63-69.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Cebula, T. and W. Koch.** 1990. Sequence Analysis of *Salmonella typhimurium* Revertants. *Mutation and the Environmental. Part D. Willey, Liss.* : 366-377.

**Chételat, A.; Albertini, S. and E. Gocke.** 1996. The photomutagenicity of fluoroquinolones en tests for gene mutation, chromosomal aberration, gene conversion and DNA breakage (Comet assay). *Mutagenesis. Vol.11, N°5* : 497-504.

**Chu, D. and P. Fernandes.** 1989. Structure-Activity Relationships of the Fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Feb.:* 131-135

**Clerch, B.** 1991. Papel del sistema SOS y del Mecanismo de Reparación por Escisión en la Mutagénesis producida por Fluoroquinolonas. *Trabajo Experimental en el Programa de Microbiología Básica. Univ. Autónoma de Barcelona.* : 101 pp.

**Clerch, B.; Barbe, J. and M. Llagostera.** 1992. The role of the excision and error-prone repair systems in mutagenesis by fluorinat quinolones in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research. 281* : 207-213.

**Clerch, B.** 1995. Estudio de la Mutagénesis Inducida por Quinolonas en *Salmonella typhimurium* y de los Mecanismos de Resistencia de *Escherichia coli* a Estos Antimicrobianaos. *Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Barcelona.*

**Clerch, B.; Bravo, J.M. and M. Llagostera.** 1996a. Analysis of the Ciprofloxacin Induced Mutations in *Salmonella typhimurium*. *Environmental and Mutagenesis 27* : 110-115.

**Clerch, B.; Bravo, J.M. and M. Llagostera.** 1996b. Efficiency of MucAB and *Escherichia coli* UmuDC proteins in quinolone and UV mutagenesis in *Salmonella typhimurium*; effect of MucA and UmuD processing. *Mutation Research. 349* : 201-208.

**Clerch, B.; Rivera, E. and M. Llagostera.** 1996c. Identification of a pKM101 Región Which Confers a Slow Growth Rate and Interferes with Susceptibility to Quinolone in *Escherichia coli* AB1157. *Jornal of Bacteriology. Oct.* : 5568-5572.

**Cohen, S.; McMurry, L.; Hooper, D.; Wolfson, J. and S. Levy.** 1989. Cross Resistance to fluoroquinolones in multiple antibiotic resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline and chloramphenicol decreased drugs accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrobial Agents Chemotherapy 33* : 1318-1325.

**Cohen-Fix, O. and Z. Livneh.** 1992. Biochemical analysis of UV mutagenesis in *Escherichia coli* by using a cell-free reaction coupled to a bioassay: Identification pf a DNA repair-dependent, replication - independent pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA. Vol.80* : 3300-3304.

**Cohen, O. and Z. Livneth.** 1994. *In Vitro* UV Mutagenesis Associated with Nucleotide Excision-Repair Gaps in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry. Vol.269, N°7*: 4953-4958.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Crowley, D. and P. Hanawalt.** 1998. Induction of the SOS Response Increase the Efficiency of Global Nucleotide Excision Repair of Cyclobutane Pyrimidine dimmers, but Not 6-4 Photoproducts in UV-Irradiated *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Jul. Vol.180, N°13 : 3345–3352.

**De Marini, D.** 2000. Influence of DNA repair on mutation spectra in *Salmonella*. *Mutation Research*. 450 : 5-17.

**Dong, Y.; Zhao, X.; Domagala, J. and K. Drlica.** 1998. Fluroquinolone Action against Mycobacteria: Effects of C-8 Substituents on Growth, Survival, and Resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol.42, N°11 : 2978-2984.

**Dower, W.; Miller, J. and C. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*. 16 : 6127-6145.

**Drlica, K. and X. Zhao.** 1997. Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Sept. Vol.61, N°3 : 377-392.

**Dronker, M. and R. Kanaar.** 2001. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation Research*. 489:217-247.

**Durbach S.; Anderson, S. and Mizrahi.** 1997. SOS Induction in *Mycobacterium* analysis of the DNA-binding activity of a LexA-like repressor and its role in DNA damage induction of the *recA* gene for *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 26: 643-653.

**Eisentadlt, E.; Miller, J.; Kahng, L. and W. Barnes.** 1989. Influence of *uvrB* and pKM101 on the spectrum of spontaneous, UV- and  $\gamma$ -ray-induced base substitutions that revert *hisG46* in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*. 210 : 113-125.

**Farr, S. and T. Kogoma.** 1991. Oxidative stress response in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* Dec.55(4) : 561–585.

**Ferguson, L. and P. Turner.** 1987. Frameshift mutagenesis by nitracrine analogues in wild type *uvrB*, *polA* and *recA* strains of *Salmonella typhimurium*, with and without plasmid pKM101. *Mutation Research*. Jul. 184(1) : 13–21.

**Fernandez de Henestroza, A.; Ogi, T.; Aoyagi, S.; Chafin, D.; Hayes, J.; Ohmori, H. and Roger Woodgate.** 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 35(6):1560-1572.

**Ferrero, L.; Cameron, B. and B. Manse.** 1994. Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV. A Primary Target of Fluoroquinolones. *Mol. Microbiol.* 13 : 641–653.

**Fisher, L.; Lawrence, J.; Josty, I.; Hopewell, R.; Margerrison, E. and M. Cullen.** 1989. Ciprofloxacin and the fluorquinolones. New concepts on the mechanism of action and resistance. *Am. J. Med.* Nov. 30; 87(5A) : 2S-8S.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Fowler, R.; White, S.; Koyama, C.; Moore, S.; Dunn, R. and R. Schaaper.** 2003. Interactions among the *Escherichia coli* *mutT*, *mutM*, and *mutY* damage prevention pathways. *DNA Repair* 2. : 159–173.

**Fridovich, I.** 1998. Oxygen Toxicity: A Radical Explanation. *The Journal of the Experimental Biology*. 201 : 1203-1209.

**Friedberg, E.; Walker, G. and W. Siede.** 1995. *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press. Washington D.C.

**García-Rodríguez y Muñoz-Bellido.** 2003. ¿Qué nuevas Quinolonas podemos Esperar?. Symposium 3. Rev. Española de Quimioterapia. Vol.16 (Sup.1).

**Gasc, M.; Sicard, N.; Clavery, J. y A. Sicard.** 1980. Lack of SOS repair in *Streptococcus pneumoniae*. *Mutation Research*. 70 : 157-165.

**Gil del Valle, L.; Martínez-Sánchez, G.; González-Blanco, I. y L. Pérez Avila.** 1999. Estrés Oxidativo : Mecanismos generales involucrados y su relación con el virus de inmunodeficiencia humana. *Bioquímica*. Vol. 24, N°4 : 85–97.

**Giraud, E.; Cloeckert, A.; Kerboeup, D. and E. Chaslus-Dancla.** 2000. Evidence for Active Efflux as the Primary Mechanism of Resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. May. Vol.44. N°5 : 1223-1228.

**Gocke, E.** 1991. Mechanism of Quinolone mutagenicity in bacteria. *Mutation Research*. 248 : 135-143.

**Gocke, E.** 2001. Photochemical mutagenesis: examples and toxicological relevance. *J. Environ. Pathol. Toxicol Oncol.* 20(4): 285-292.

**Goldsmith, M.; Sarov-Blat, L. and Z. Livneh.** 2000. Plasmid-encoded MucB protein is a DNA polymerase (pol RI) specialized for lesion bypass in the presence of MucA', and SSB. *PNAS*. Oct. Vol.97, N°21 : 11227–1131.

**González, M. and R. Woodgate.** 2002. The “tale” of UmuD and its role in SOS mutagenesis. *BioEssays*. 24.2 : 141–148.

**González-Flecha, B. and B. Demple.**1997. Transcriptional Regulation of the *Escherichia coli* *oxyR* Gene as a function of Cell Growth. *Journal of Bacteriology*. Oct. Vol.179, N°19 : 6181–6186.

**González-Flecha, B. and B. Demple.** 1999. Rol for the *oxyS* Gene regulation of Intracellular Hydrogen Peroxide in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Jun. Vol.181, N°12 : 3833–3836.

**Hall, B.** 1998. Adaptive Mutagenesis at *ebgR* is Regulated by *PhoPCD*. *Journal of Bacteriology*, Vol.180. N°11. 2862-2865.

**Hall, B.** 1999. Spectra of Spontaneous Growth-Dependent and Adaptive Mutations at *ebgR*. *Journal of Bacteriology*. Vol.181, N°4. 1149-1155.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Hallet , P. and A. Maxwell.** 1991. Novel quinolone resistance mutations of the *Escherichia coli* DNA gyrase protein : enzymatic analysis of the mutant proteins. *Antimicrobial Agents Chemother.* 35 : 335-340.

**Hansberg, W.** 2002. Biología de las Especies de Oxígeno Reactivas. *Universidad Nacional Autónoma de México.* <http://laguna/fmedic.unam.mx>.

**Hartman, P.; Ames, B.; Roth, J.; Barnes, W. and D. Levin.** 1986. Target Sequences for Mutagenesis in Salmonella Histidine-Requiring Mutants. *Alan R. Liss, Inc.* : 632-641.

**Herbold, B.; Bredler-Schwaab, S. and H. Jürgen Ahr.** 2001. Ciprofloxacin in vivo genotoxicity studies. *Mutation Research.* 498 : 193-205.

**Herrera, G.; Blanco, M. y J. O'Connor.** 1999. Análisis por citometría de flujo de indicadores de estrés oxidativo en mutantes oxyR de *Escherichia coli*. En De la Peña, E.; Bourguete, I.; Guadaño, A.; pp. 45-53, en *Evaluación Mutagénica y Genotóxica.* Edit. Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación. Ministerio de Educación y Cultura.

**Hooper, D. and J. Wolfson.** 1993. Mechanism of Bacterial resistance to quinolone. In Hooper D.C. y Wolfson, J.S. (eds.). *Quinolone Antimicrobial Agents*, pp.97-118. ASM. Washington D.C.

**Hooper, D.** 1995. Quinolone mode of action. *Drugs.* 49 (Suppl.2) : 10–15.

**Hooper, D.** 2001. Mechanism of Action of Antimicrobial: Focus on Fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases.* 32 : S9-S15.

**Horii, T.; Ogawa, T.; Nakatani, T.; Hase, T.; Matsubara, H. and H. Ogawa.** 1981. Regulation of SOS functions : Purification of E. coli LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. *Cell.* 27 : 515-522.

**Howard, B.; Pinney, R. and J. Smith.** 1993. Function of the SOS Process in Repair of DNA Damage Induced by Modern 4-Quinolones. *J. Pharm. Pharmacol.* 45 : 658-662.

**Inman, M.; Butler, MA. Connor, TH, and TS, Matney.** 1983. The effects of excision repair and the plasmid pKM101 on the induction of his<sup>+</sup> revertants by chemical agents in *Salmonella typhimurium*. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 3(6) : 491-501.

**Itoh, S.; Nakayama, Sh. and H. Shimada.** 2002. *In vitro* photochemical clastogenicity of quinolone antibacterial agents studied by a chromosomal aberration test with light irradiation. *Mutation Research.* 517 : 113-121.

**Janion, C.** 2000. A new look at adaptative mutations in bacteria. *Acta Biochimica Polonica.* Vol.47, N°2 : 451-457.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Janion, C.** 2001. Some aspects of the SOS response system – A critical survey. *Acta Biochimica Polonica*. Vol.48, N°3 : 599–610.

**Joshi, M.; Johnson, J. and K. Rajagopalan.** 1996. Molybdenum Cofactor Biosynthesis in *Escherichia coli mod* and *mog* Mutants. *Journal of Bacteriology*. July. : 4310-4312.

**Kato, T.; Watanabe, M. and T. Ohta.** 1994. Induction of the SOS response and mutations by reactive oxygen-generating compounds in various *Escherichia coli* mutants defective in the *mutM*, *mutY* or *soxRS* loci. *Mutagenesis*. May; 9(3): 245–251.

**Kawanishi, Sh.; Hiraku, Y. and Sh. Oikawa.** 2001. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and ageing. *Mutation Research*. 488 : 65-76.

**Keyer, K.; Strohmaier, A. and J. Imlay.** 1995. Superoxide and the Production of Oxidative DNA Damage. *Journal of Bacteriology*. Dec. Vol.177, N°25 : 6762 – 6790.

**Khodursky, A. and N. Cozzarell.** 1998. The Mechanism of Inhibition of Topoisomerase IV by Quinolone Antibacterials. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.273, N°42 : 27668-27677.

**King, D.; Malone, R. and S. Lilley.** 2000. New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics. *American Family Physician*. May.2-12.

**Klepser, m.; Ernst, E.; Petzold, R.; Rhomberg, P. and G. Doern.** 2001. Comparative Bactericidal Activities of Ciprofloxacin, Clinafloxacin, Grepafloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, and Trovafloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. In a Dynamic In Vitro Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Mar. Vol.45, N°3 : 673-678.

**Koch, W.; Henrikson, E. and T. Cebula.** 1996. Molecular Analysis of *Salmonella hisG428* ochre revertants for rapid characterization of mutational specificity. *Mutagenesis*. Vol. 11, N°4 : 341-348.

**Koch, WH.; Henrikson, EN. and TC. Cebula.** 1996. Molecular analysis of *Salmonella hisG428* revertants for rapid characterization of mutational specificity. *Mutagenesis*. Jul.11(4) : 341–348.

**Kojima, M.** 1997. Mechanism for the development of quinolone resistance. *Nippon Rinsho*. May.55(5) : 1252-1260.

**Kozmin, S.; Pavlov, Y.; Dunn, R. and R. Schapaper.** 2000. Hypersensitivity of *Escherichia coli*  $\Delta(uvrB-bio)$  Mutants to 6-hidroksilaminopurine and Other Base Analogs Is Due to a Defect in Molybdenum Cofactor Biosynthesis. *Journal of Bacteriology*. June : 3361-3367.

**Kullik, I.; Stevens, J.; Toledano, J. and G. Storz.** 1995. Mutational Analysis of the Redox-Sensitive Transcriptional Regulator OxyR: Regions Important for DNA

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Binding and Multimerization. *Journal of Bacteriology*. Mar. Vol. 177, N°5 : 1285–1291.

**Kunz, B. and B. Glickman.** 1984. The Role of pyrimidine Dimers as Premutagenic Lesions: A Study of Targeted Vs Untargeted Mutagenesis in the *lacI* Gene of *Escherichia coli*. *Genetics*, 106: 347-364.

**Kupchella, E.; Koch, W. and T. Cebula.** 1994. Mutant Alleles of *tRNA<sup>Thr</sup>* Genes Suppress the *hisG46* Missense Mutation in *Salmonella typhimurium*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 23 : 81-88.

**Kuzminov, A.** 1999. Recombinational Repair of DNA Damage in *Escherichia coli* and Bacteriophage  $\lambda$ . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Dec. Vol.63, N°4 : 751–813.

**Lage, C.; Pádula, M.; Amorin, T. ; Fonseca, S. ; da Silva, L.; Cabral, J. and A. Costa.** 2003. New insights on how nucleotide excision repair could remove DNA adducts induced by chemotherapeutic agents and psoralens plus UV-A (PUVA) in *Escherichia coli* cells. *Mutation Research* 544: 143-157.

**Levin, D.; Hollstein, M.; Christman, M.; Schwiers, E. and B. Ames.** 1982 – A new *Salmonella* tester (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*. Dec.79(23) 7445–7449.

**Levin D.; Marnett; I. and B. Ames.** 1984. Spontaneous and mutagen-induced deletions: Mechanistic studies in *Salmonella* tester strain TA102. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (81) : 4457-4461.

**Lewin C. and J. Smith.** 1988. Bactericidal mechanism of Ofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 22:1-8.

**Lewin, C.; Howard, B.; Ratcliffe, N. and J. Smith.** 1989. 4-Quinolones and SOS response. *J. Med. Microbiol.* Vol.29 : 139-144.

**Lewin, B.** 2001 *Genes VII*. Edit. *MARBÁN Libros*. Oxford University Press.: 989.

**Liu, X. and T. Ferenci.** 1998. Regulation of Porin-Mediated Outer Membrane Permeability by Nutrient Limitation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Aug. Vol.180, N°15 : 3917-3922.

**Livneh, Z.** 2001. DNA Damage Control by Novel DNA Polymerase Translesion Replication and Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 276, N°28 : 25639–25642.

**Lu, A.; Li, X.; Gu, Y.; Wrigth, P. and D. Chang.** 2001. Repair of Oxidative DNA Damage: Mechanisms and Functions. *Cell Biochem Biophys*. 35 (2) : 141-170.

**Mamber, S.; Kolek, B.; Brookshire, K.; Bonner, D. and J. Fung-Tomc.** 1993. Activity of Quinolones in the Ames *Salmonella* TA102 Mutagenicity Test and Other Bacterial Genotoxicity Assays. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. Feb. : 213-217.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Maniatis, T.; Fritsch, E. and K. Sambrook.** 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbord Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.*

**Maron. D. and B. Ames.** 1983 - Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research.* 113 : 173-215.

**Martinez, A.; Urios, A. and M. Blanco.** 1999. Mutagenicity of thiol compounds in *Escherichia coli* WP2 tester strain IC203, deficient in OxyR: effects of S9 fractions from rat liver and kidney. *Mutation Research.* 446 : 205-213.

**Martinez, A.; Urios, A. and M. Blanco.** 2000. Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in OxyR, and its *oxyR*<sup>+</sup> parent WP2 *uvrA/pKM101* : detection of 31 oxidative mutagens. *Mutation Research.* 467: 41-53.

**Martinez, J.; Alonso, A.; Gomez-Gomez, J. and F. Baquero.** 1998. Quinolone resistance by mutations in chromosomal gyrase genes Just the tip of the iceberg?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* N°42 : 683-688.

**Martinez, J. and F. Baquero.** 2000. Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* July : 1771-1777.

**Marutani, K.; Matsumoto, M.; Otabe, Y.; Nagamuta, M.; Tanaka, K.; Miyoshi, A.; Hasegawa, T.; Matsubara, S. and R. Kamide.** 1993. Reduced phototoxicity of a fluoroquinolone antibacterial agent with a methoxy group at the 8 position in mice irradiated with long-wavelength UV light. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Oct. Vol.37, N°10 : 2217-2223.

**Mason, D.; Power, G.; Talsania, H.; Philips, I. and V. Gant.** 1995. Antibacterial Action of Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherphthy.* Dec. Vol.39, N°12 : 2752-2758.

**Maupin-Furlow, J.; Rosentel, J.; Ho Lee, J.; Deppenmeier, U.; Gunsalus, R. and K. Shanmugam.** 1995. Genetic Analysis of the *modABCD* (Molybdate Transport) Operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* Sept. : 4851-4856.

**Maxwell, A.** 1992. The Molecular basic of Quinolone actino. *J. Antimicrob. Chemotherap.* 30: 409-416.

**Michan, C.; Manchado, M.; Dorado, G. and C. Pueyo.** 1999. - In Vivo transcription of the *Escherichia coli oxyR* Regulon as a function of Growth phase and in Response to Oxidative Stress. *Journal of Bacteriology.* May, , Vol. 181, N°9 : 2759-2764.

**Mizrahi, V. and S.J. Anderson.** 1998. DNA Repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence?. *Mol. Microbiol.* 29 : 1331-1339.

**Moller, P. and H. Wallin.** 1998. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutation Research.* 410 : 271-290.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Moolenaar, G.; Rossum-Fikkert, S.; Van Kesteren, M. and N. Goosen.** 2002. Cho, a second endonuclease involved in *Escherichia coli* nucleotide excision repair *Vol.99, N°3 : 1467-1472.*

**Mortelmans, R. and E. Riccio.** 2000. The Bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutation Research. 455 : 61-69.*

**Munshi, M.; Sack, D.; Haider, K.; Ahmed, Z.; Rahaman, M. and M. Morshed.** 1987. Plasmid mediated resistance to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type I. *Lancet. 22;2: 419-422.*

**Muñoz-Najar, U. and M.N. Vijayakumar.** 1999. An operon that confers UV resistance by evoking the SOS mutagenic response in Streptococcal conjugative transposon Tn5252. *Journal of Bacteriology, 181 : 2782-2788.*

**Murray, M.** 1979. Substrate-Specificity of *uvrB* Excision Repair. *Environmental. Mut.I: 347-352.*

**Nunoshiba, T. and K. Yamamoto.** 1999 - Role of glutathione on acrolein-induced cytotoxicity and mutagenicity in *Escherichia coli* *Mutation Research. 442 : 1-8.*

**Ogawa, T.; Wabiko, T.; Tsurimoto, T.; Horii, H.; Masukata, H. and H. Ogawa.** 1979. Characteristic of purified RecA protein and the regulation of its synthesis *in vitro.* *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 909.*

**Ozeki, Sh.; Deguchi, T.; Yasuda, M.; Nakano, M.; Kawamura, T.; Nishino, Y. and Y. Kawada.** 1997. Development of a rapid assay for detecting *gyrA* Mutations in *Escherichia coli* and determination of Incidence of *gyrA* Mutations in Clinical Strains Isolated Patients with Complicated Urinary tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology. Sep. Vol.35, N°9 : 2315-2319.*

**Palumbo, M.; Gatto, B.; Zagotto, G. and Palú,** 1993. On the mechanism of action of quinolone drugs. *Trends in Microbiol. 1.232-235.*

**Pan, X.; Ambler J.; Mehtar, S. and L.M. Fisher.** 1996. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae.* *Antimicrobial Agents Chemotherap. 40 : 2321-2326.*

**Pan, X. and L.M. Fisher.** 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV are dual target of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae.* *Antimicrobial Agents Chemother. 42 : 2810-2816.*

**Perera, J.; Tormo, A. y J. García.** 2002a. Ingeniería Genética. Preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA. *Vol I. Edit. Síntesis. Madrid. 527 pp.*

**Perera, J.; Tormo, A. y J. García.** 2002b. Ingeniería Genética. Expresión de DNA en sistemas Heterólogos. *Vol II. Edit. Síntesis. Madrid. 392 pp.*

**Pascual, A.** 2003. La resistencia como factor limitante de la utilización de quinolonas. *Symposium 3. Revis. Española de Quimioterapia. Vol.16 (Sup.1).*

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Pham, P.; Bertram, J.; O'Donnelt, M.; Woodgate, R. and M. Goodman.** 2001a. A model for SOS-lesion-targeted mutations in *Escherichia coli*. *Nature* 409 : 366–370.

**Pham, P.; Rangarajan, S.; Woodgate, R. and M. Goodman.** 2001b. Roles of DNA polymerases V and II in SOS-induced error-prone and error-free repair in *Escherichia coli*. *PNAS*. Jul.17 Vol.98 N°15 : 8350–8354.

**Pham, P, Seitz, E.; Saveliev, S.; Shen, X.; Woodgate, R.; Cox, M. and Goodman, M.** 2002. Two distinct modes of RecA action are required for DNA polymerase V – catalysed translesion synthesis. *PNAS*. Vol 99, N°17 : 11061–11066.

**Philips, I.; Culebras, E.; Moreno, F. and F. Baquero.** 1987. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J. of Antimicrobial Chemotherapy*, 20 : 631-638.

**Piddock, L. and R. Wise.** 1987. Induction of the SOS response in *Escherichia coli* by 4-quinolone antimicrobial agents. *FEMS Microbiology Letters*, 41 : 289-294.

**Piddock, L.; Walters, R. and T. Diver.** 1990. Correlation of quinolone MIC and Inhibition of DNA, RNA, and Protein Synthesis and Induction of the SOS Response in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Dec. : 2331-2336.

**Piddock, L.** 2002. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiology Reviews*. 26 : 3-16.

**Pomposiello, P. and B. Demple.** 2001. Redox - operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends in Biotechnology*. March, Vol.19 : 109-114.

**Porwollik, S.; Mei-Yi Wong, R.; Sims, S.; Schaaper, R.; DeMarini, D. and M. McClelland.** 2001. The  $\Delta$ *uvrB* mutations in the Ames strains of *Salmonella* span 15 to 119 genes. *Mutation Research*. 483 : 1-11.

**Power, EG. and I. Phillips.** 1993. Correlation between umuC induction and *Salmonella* mutagenicity assays for quinolone antimicrobial agents. *FEMS Microbiol Lett*. Set.15; 112(3) : 251-254.

**Ramón, MS.; Canton, E.; Pemán, J.; Pastor, A. And JP. Martinez.** 1999. Mechanisms of action of quinolones against *Staphylococci* and relationship with their in vitro bactericidal activity. *Chemotherapy* 45: 175-182.

**Ramos, I.; Lipman, R.; Tomasz, M. And A. Basu.** 1998. The major Mitomycin C-DNA Monoadduct is Cytotoxic but not Mutagenic in *Escherichia coli*. *Chem. Res.Toxicol*. 11:64-69.

**Reece, R. and A. Maxwell.** 1991. DNA Gyrase : Structure and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 26(3/4) : 335-375.

**Riesenfeld, C.; Everett, M.; Piddock, L. and B. Hall.** 1997. Adaptive Mutations Produce Resistance to Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. Sept.Vol.41, N°9 : 2059-2060.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Roca, A. and M. Cox.** 1997. RecA protein ; Structure, function and role in recombinational DNA repair. *Prog. Nucleic Acid. Res.* 56 : 129-233.

**Rosales, C.** 1998. Efecto del Nivel Intracelular de las Proteínas Umu y de sus Análogos de la Mutagénesis SOS Inducida por Agentes Físicos y Químicos en *Salmonella typhimurium*. *Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Barcelona.* 196 pp.

**Rosen, J.; Chen, D.; Prahalad, A.; Spratt, T.; Schluter, G. and G. Williams.** 1997. A Fluoroquinolone Antibiotic with a Methoxy Group at the 8 Position Yields Reduced Generation of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine after Ultraviolet-A irradiation. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 145 : 381-387.

**Rosentel, J.; Healy F.; Maupin-Furlow, J.; Ho Lee, J. and K. Shanmugam.** 1995. Molybdate and Regulation of *mod* (Molybdate Transport), *fdhF*, and *hyc* (Formate Hydrogenlyase) Operons in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* Sept. : 4857-4864.

**Ruiz, J.; Gómez, J.; Navia, M.; Ribera, A.; Sierra, J.; Marco, F.; Mensa, J. and J. Vila.** 2002. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 42 : 257-261.

**Ruiz-Laguna, J. and C. Pueyo.** 1999. Hydrogen Peroxide and coffe induce G:C -> T:A transversions in the *lacI* gene of catalasa-defective *Escherichia coli*. *Mutagenesis.* Vol.14, N°1: 95-102.

**Sambrook, J.; Frisch, E. and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2ªEdic. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sancar, A.; Stachelek, C.; Konigsberg, W. and D. Rupp.** 1980. Sequences of the *recA* gene and protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2611-2615.

**Sánchez Díaz, P.** 2003. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. Revis. Española de Quimioterapia. Vol.16(N°2): 172-187.

**Sanderson, K.; Hessel, A. and K. Rudd.** 1995. Genetic Map of *Salmonella typhimurium*, Edition VIII. *Microbiological Reviews.* Jun. Vol.59, N°2 : 241-303.

**Sedgwick, S.; Ho, CH. and R. Woodgate.** 1991. Mutagenic DNA Repair in Enterobacteria. *Journal of Bacteriology.* Set. Vol 173, N°18 : 5604-5611.

**Shen, L.; Mitscher, L.; Sharma, P.; O'Donnel, T.; Chu, D.; Cooper, C.; Rosen, T. and A. Pernet.** 1989. Mechanism of inhibition of DNA Gyrase by quinolone antibacterials : a cooperative drugs-DNA binding model. *Biochemistry.* 28 : 3886-3894.

**Shen, L.** 1993. Quinolone-DNA Interaction. Quinolone Antimicrobial Agents. 2ª Edic.77-95.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Slader, F.; Melian, A. and P. Howard-Flanders.** 1989. Incision by UvrABC excinuclease is a step in the path to mutagenesis by psoralen crosslinks in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.86* : 3982-3986.
- Slezarikova, V.; Sedliakova, M.; Andreeva, IV; Rusina, O. and M. Skavronskaya.** 1992. Effect of plasmid pKM101 in ultraviolet irradiated *uvr<sup>+</sup>* and *uvr<sup>-</sup>* *Escherichia coli*. *Mutation Research. Nov. 16;270(2)* : 145-149.
- Snyder, R. and J. Green.** 2001. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutation Research. 488* : 151-169.
- Storz, G.; Christman, M.; Sies, H. and B. Ames.** 1987. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Dec. 84(24)* 8917-8921.
- Strike, P. and D. Lodwick.** 1987. Plasmid Gene affecting DNA Repair and Mutation. *J. Cell Sci. 6* : 303-321.
- Svoboda, D.; Smith, C.; Stephan, J.; Taylor, A. and A. Sancar.** 1993. Effect of Sequence, Adduct Type, and Opposing Lesions on the Binding and Repair of Ultraviolet Photodamage by DNA Photolyase and (A)BC Excinuclease. *The Journal of Biological Chemistry. Vol.268 N°14:10694-10700*.
- Takayama, S.; Kato, M. and H. Shimada.** 1995. Toxicity of quinolones antimicrobial agents. *Journal of Toxicology and Environmental Health. 45* : 1-45.
- Taléns-Visconti, R.; Garrigues, T. y E. Cantón.** 2002. Quinolonas y *Streptococcus pneumoniae*. Mecanismos de acción y Resistencia. *Rev, Exp.Quimioterapia. Vol.15, N°4* : 313-324.
- Tálens-Visconti, R.** 2001. Actividad Antimicrobiana *in vitro* de nuevas 6-fluoroquinolonas de administración por vía oral. Relación estructura-actividad. *Tesis Doctoral-Universidad de Valencia, Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica*.
- Tang, M.; Shen, X.; Frank, E.; O'Donnell, M. and R. Woodgate.** 1999. UmuD'2C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli*. *Pol V. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol 96* : 8919-8924.
- Tao, K.** 1999. In vivo oxidations-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in *Escherichia coli*. *FEBS Letters. 457* : 90-92.
- Tapias, A.** 2000. Caracterización de la región Reguladora del sistema SOS en el grupo alfa de las Proteobacterias. Tesis Doctoral. Dpto de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Termini, J.** 2000. Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations. *Mutation Research. 450* : 107-124.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Theis, K.; Chan, P.; Skorvaga, M.; Van Houten, B. and C. Kisker.** 1999. Crystal structure of UvrB, a helicase adapted for nucleotide excision repair. *The EMBO Journal*. Vol.18 N°24 : 6899-6907.

**Theis, K.; Skorvaga, M.; Machius, M.; Nakagawa, N.; Van Houten, B. and C. Kisker.** 2000. The nucleotide excision repair protein UvrB, a helicase-like enzyme with a catch. *Mutation Research*. 460 : 277 – 300.

**Umezawa, N.; Arakane, K.; Ryu, A. and S. Mashiko.** 1997. Participation of Reactive Oxygen in Phototoxicity Induced by Quinolone Antibacterial Agents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol.342, N°2. June 15 : 275–281.

**Urios, A.; Herrera, G. and M. Blanco.** 1995. Detection of oxidative mutagens in strains of *Escherichia coli* deficient in the OxyR or MutY functions : dependence on SOS mutagenesis. *Mutations Research*. Nov. 332(1-2) : 9–15.

**Urios, A. and M. Blanco.** 1996a. Specificity of spontaneous and *t*-butyl hidroperoxide-induced mutations in  $\Delta$ *oxyR* strains of *Escherichia coli* differing with respect to the SOS mutagenesis proficiency and to the MutY and MutM functions. *Mutation Research*. 354 : 95–101.

**Urios, A. and M. Blanco.** 1996b. Induction of SOS-independent mutations by benzo[a]pyrene treatment in *Escherichia coli* cells deficient in MutY or MutM DNA glycosilases : possible role of oxidative lesions. *Mutation Research*. 356 : 229–335.

**Vaisman, A.; Frank, E.; McDonald, J.; Tissier, A. and R. Woodgate.** 2002. pol<sup>I</sup>-dependent lesion bypass in vitro. *Mutation Research*. 510 : 9–22.

**Van Houten, B.; Eisen, J. and P. Hanawalt.** 2002. A cut above : Discovery of an Alternative Excision repair Pathways in bacterial. *PNAS*. Vol.99, N°5 : 2581-2583.

**Verhoeven, E.; Wyman, Moolenaar, G. and N. Grosen.** 2002. The presence of two UvrB subunits in the ensures damage detection in both DNA strands. *The EMBO Journal*. Vol.21, N°15:4196-4205.

**Vila, J.; Ruiz, J.; Marco, F.; Barceló, A.; Goñi, A.; Giral, F. and T. Jimenez de Anta.** 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*. 38 : 2477-2479.

**Vila, J.; Ribera, A.; Marco, F.; Ruiz, J.; Mensa, J.; Chávez, J.; Hernandez, G. and T. Jimenez de Anta.** 2002a. Activity of Ciprofloxacin, compared with six other quinolones, against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49 : 471-477.

**Wagneri, J. and T. Nohmi.** 2000. *Escherichia coli* DNA Polymerase IV Mutator Activity: Genetic Requirements and Mutational Specificity. *Journal of Bacteriology*. August, Vol.182, N°16 : 4587-4595.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Walker, G.** 1987. Isolation and Characterization of Mutants of the Plasmid pKM101 Deficient in their Ability to Enhance Mutagenesis and Repair. *Journal of Bacteriology. Mar. Vol.133, N°3 : 1203-1211.*
- Wang, Z.** 2001. Translesion synthesis by the UmuC family of DNA polymerase. *Mutation Research. 486 : 59-70.*
- Watanabe, K.; Sakamoto, K. and T. Sasaki.** 1998a. Comparasions of chemically-induced mutation among four bacterial strains, *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638, and *Escherichia coli* WP2/pKM101 and WP2 *uvrA*/pKM101: collaborative study II. *Mutation Research. 412 : 17-31.*
- Watanabe, K.; Sasaki, T. and K. Kawakami.** 1998b. Comparasions of chemically-induced mutation among four bacterial strains, *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638, and *Escherichia coli* WP2/pKM101 and WP2 *uvrA*/pKM101: collaborative study III and evaluation of the usefulness of these strains. *Mutation Research. 416 : 169-181.*
- Weber, M. and L. Piddock.** 2001. Absence of Mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-Overexpressing Fluoroquinolone-Resistant Clinical and Veterinary Isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, May. Vol.45, N°5 : 1550-1552.*
- Wickens, H. and R. Pinney.** 2001. Investigation of Smith's quinolone killing mechanisms during the PAE of Ciprofloxacin on *Escherichia coli*. *International Journal of Pharmaceutics. 227 : 149-156.*
- Willmott, C.; Critchlow, S.; Eperon, I.; and A. Maxwell.** 1994. The Complex of DNA Gyrase and Quinolone Drugs with DNA Forms a Barrier Transcription by RNA Polymerase. *J. Mol. Biol. 242 : 351-363.*
- Wolfson, J. and D. Hooper.** 1989. Fluoroquinolone Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews. Oct. Vol.2, N°4 : 378-224.*
- Yamada, M.; Sofuni, T. and T. Nohmi.** 1992. Preferential induction of AT-TA transversion, but not deletions, by chlorambucil at the *hisG428* site of *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research. 283 : 29-33.*
- Yoshida, H.; Nakamura, M.; Bogaki, M.; Ito, H.; Kojima, T.; Hattori, H. and Sh. Nakamura.** 1993. Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Ap. Vol.37, N°4 : 839-845.*
- Ysern, P.; Clerch, B.; Castaño, M.; Gibert, I.; Barbe, J. and M. Llagostera.** 1990. Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. *Mutagenesis. Vol.5, N°1 : 63-66.*
- Zeller, V.; Janoir, C.; Kitzis, M.; Gutmann, L. and N. Moreu.** 1997. Active Efflux as a Mechanism of Resistance to Ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Sept. Vol-41, N°9 : 1973-1978.*

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Zhao, X.; Xu, Ch.; Domagala, J. and K. Drlica.** 1997. DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones : A strategy for avoiding bacterial resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol.94 : 13991-13996.

**Zhao, X. and K. Drlica.** 2002. Restricting the selection of Antibiotic-Resistant Mutant Bacteria: Measurement and potential Use of the Mutant Selection Window. *The Journal of Infections Diseases.* 185 : 561-565.

**Zheng, M.; Astund, F.; and G. Storz.** 1998. Activation of the OxyR Transcription Factor by Reversible Disulfide Bond Formation. *Science.* Vol. 279, N°13 : 1718-1721.

**Zheng, M.; Doan, B.; Schneider, T. and G. Storz.** 1999. OxyR and SoxRS Regulation *fur.* *Journal of Bacteriology.* Aug, Vol.181, N°15 : 4639–4643.

**Zheng, M. and G. Storz.** 2000. Redox sensing by Prokaryotic Transcription Factors. *Biochemical Pharmacology.* Vol.59 : 1-6.

**Zheng, M.; Wang, X.; Templeton, L.; Smulski, D.; Larosa, R. and G. Storz.** 2001. DNA Microarrays-Mediated Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Response to Hydrogen Peroxide. *Journal of Bacteriology.* Aug. Vol.183, N°15 : 4562-4570.

**Zhou. J.; Dong, X.; Zhao, S. ; Lee, S. ; Amin, A. ; Ramaswarny, S. ; Domagala, J. ; Musser, J. and K. Drlica.** 2000. Selection of antibiotic-resistant bacterial mutants : Allelic diversity among fluoroquinolone-resistant mutations. *J. Infect. Dis.* 182 : 517-525.