

Clonación del gen *uvrB*, operón *Moa* y requerimientos del complejo UvrABC durante la mutagénesis por quinolonas en cepas de *Salmonella typhimurium* ($\Delta uv r B$ y $\Delta moa A-E$)

Gen *uvrB* cloning, *Moa* operon, and UvrABC complex requirement during quinolones mutagenesis in *Salmonella typhimurium* ($\Delta uv r B$ y $\Delta moa A-E$)

José G. González Cabeza¹

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. 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, que 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.

El conjunto de estos resultados indica que las quinolonas deben 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 tendiente al error, análoga a MucAB y que introduciría una mutación. Este mecanismo de mutagénesis debe ser común a este tipo de moléculas.

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.

Palabras clave: Clonación, operón, mutagénesis, quinolonas, NER, *Salmonella typhimurium*.

¹ Doctor en Biotecnología. Grupo de Genética y Biotecnología. Universidad Privada Antenor Orrego.

ABSTRACT

Given the clinic importance of the quinolones in the control of infectious diseases and their possible involvement in the bacterial mutagenesis, this study has been focused to gain insight into the mutagenesis mechanisms using ciprofloxacin as a model. In reference to the mutagenic mechanisms, it has been shown that bacteria must own a functional nucleotide excision repair system (NER) for taking part the ciprofloxacin-induced mutagenesis. Furthermore, it has been rule out that *moa* operon, which codifies genes participating in the biosynthesis of molybdenum cofactors, has a role in such mutagenesis process.

These results support early studies which suggested the participation of NER in the above mentioned mutagenesis and indicate that likely other deleted genes apart from *uvrB* in the tester strains TA104 and TA2659 of *Salmonella typhimurium* may not have an important role in the quinolones mediated mutagenesis.

All these results together indicate that quinolones have to produce different kinds of DNA lesions in bacterial cells. Thus the interaction of quinolone molecule with the DNA-DNA gyrase complex has to generate a type of distortion analogue to an interchain bond, giving rise to a premutagenic lesion. This lesion can be processed by the NER system and become a mutagenic lesion that could be bypassed by an error-prone DNA polymerase (as MucAB) introducing a mutation. Such mutagenic mechanism has to be common to that kind of molecules.

Having in mind this results the possible implications of the pathogen population exposition to low doses of quinolones is discussed, and it is proposed that these studies are key for the development of new quinolone molecules, which should present both a higher antibacterial and a low capability of mutagenic activities.

Key words: Cloning, operon, mutagenesis, quinolones, NER, *Salmonella typhimurium*.

INTRODUCCIÓN

Las primeras sugerencias de que las quinolonas podían dar lugar a sucesos mutacionales en bacterias están referidas a los ácidos nalidíxico 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⁻ a His⁺ (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 delecionado, poseen una mayor permeabilidad y contienen el plásmido pKM101, que 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. Typhi-

murium 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 *hisG428* 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 codon 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.

Conjuntamente 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, la utilización

de la cepa TA102 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 agentes inductores conocidos 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: ¿Porqué 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 presentando 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*⁻, 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 (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-hidroxilaminopurinas (N-6-hidroxadenina) (HAP) y la 2-amino-6-hidroxilaminopurina (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).

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 propósito del presente trabajo ha sido profundizar en los mecanismos de mutagénesis de estos compuestos. Para ello, los objetivos concretos planteados fueron i) Estudiar la posibilidad de que algunas regiones genómicas colindantes a la delección $\Delta uv r B$, como el operon *moa* (genes *moaA*, *moaB*, *moaC*, *moaD* y *moaE*), puedan modular la mutagénesis por ciprofloxacina. ii) Analizar el requerimiento de UvrA y UvrB en la mutagénesis por ciprofloxacina.

Cuadro 1
Características de plásmidos empleados en el presente estudio

Plásmido	Características relevantes	Procedencia
pGEM [®]	F1 ori, <i>lacZ</i> (α), (Ap ^R)	Lab. Promega
pUA199	pACYC177 [®] , con fragmento <i>mucAB</i> (Km ^R).	Lab.Gen.Mol.UAB
pUA1029	pGEM [®] 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 ^R)	Este trabajo
pUA1027	pGEM [®] 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 ^R)	Este trabajo
pK184	p15A ori, <i>lacZ</i> (α), (Km ^R)	Lab.Gen.Mol.UAB
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 ^R)	Este trabajo
pUA1042	pGEM [®] 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 ^R)	Este trabajo
pUA1041	pk184 con banda recuperada mediante <i>Hind</i> III a partir de pUA1042, que contiene el operon <i>moa</i> ; (Km ^R)	Este trabajo

Cuadro 2
Cepas de *S. enterica* Serovar. Typhimurium empleadas en el presente estudio

Cepa	Características relevantes	Procedencia
LT2	Silvestre.	J. Casadesus
TA98	<i>hisD3052</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>gal</i> , <i>bio</i> , <i>chl1008</i> , <i>rfa</i> 1004 / pKM101 (Ap ^R)	B. Ames
TA102	<i>his</i> Δ (G) 8476; <i>rfa</i> 1027 / pAQ1 (Tc ^R) / pKM101 (Ap ^R)	B. Ames
TA2659	LT2, <i>hisG428</i> , <i>uvrB</i> , <i>gal</i> , <i>bio</i> , <i>chl1057</i> , <i>rfa1028</i>	B. Ames
YG3003	Como TA102 pero <i>mutM_{st}::Km^R</i>	T Nohmi
LB5000	LT2, <i>trp</i> , <i>metA</i> , <i>metE</i> , <i>rpsL</i> , <i>flaA</i> , RM ⁺	B. Stocker
TW180 / pUA199	<i>hisG428</i> , <i>zea-618::Tn10 umuD1C1</i> (Cm ^R) / pUA199 (Km ^R)	B. Clerch
TA104	<i>his G428</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> , <i>chl1004</i> , <i>galE503</i> , <i>rfa1028</i> / pKM101 (Ap ^R)	B. Ames
LB5000 / pGEM [®]	LB5000 / pGEM [®] (Ap ^R)	Este trabajo
LB5000 / pK184	LB5000 / pK184 (Km ^R)	Este trabajo
LB5000 / pUA1029	LB5000 / pUA1029 (Ap ^R)	Este trabajo
LB5000 / pUA1027	LB5000 / pUA1027 (Ap ^R)	Este trabajo
LB5000 / pUA1042	Lb5000 / pUA1042 (Ap ^R)	Este trabajo
LB5000 / pUA199	LB5000 / pUA199 (Km ^R)	Este trabajo
UA1805	TA2659 / pGEM [®] (Ap ^R)	Este trabajo
UA1806	TA2659 / pUA199 (Km ^R)	Este trabajo
UA1812	TA2659 / pUA199 (Km ^R) / pGEM [®] (Ap ^R)	Este trabajo
UA1813	Ta2659 / pUA199 (Km ^R) / pUA1027 (Ap ^R)	Este trabajo
UA1814	TA2659 / pUA199 (Km ^R) / pUA1029 (Ap ^R)	Este trabajo
UA1815	TA2659 / pUA1029 (Ap ^R)	Este trabajo
UA1816	TA2659 / pUA1027 (Ap ^R)	Este trabajo
UA1817	TA104 / pKM101 (Ap ^R) / pK184 (Km ^R)	Este trabajo
UA1818	TA104 / pKM101 (Ap ^R) / pUA1040 (Km ^R)	Este trabajo
UA1819	TA104 / pKM101 (Ap ^R) / pUA1041 (Km ^R)	Este trabajo

Cuadro 3
Cepas de *Escherichia coli* empleadas en el presente estudio

Cepa	Características relevantes	Procedencia
Dh5*	$\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15}$, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r_t^+ , m_x^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169}$	Sambrook <i>et al.</i> 1998
DH5 / pGEM*	Dh5 α / pGEM* (Ap ^R)	Este trabajo
DH5 / pUA199	Dh5 α / pUA199 (Km ^R)	Este trabajo
DH5 / pK184*	Dh5 α / pK184* (Km ^R)	Este trabajo
DH5 / pUA1029	Dh5 α / pUA1029 (Ap ^R)	Este trabajo
DH5 / p1027	Dh5 α / pUA1027 (Ap ^R)	Este trabajo
DH5 / pUA1042	Dh5 α / pUA1042 (Ap ^R)	Este trabajo
DH5 / pUA1040	Dh5 α / pUA1040 (Km ^R)	Este trabajo
DH5 / pUA1041	Dh5 α / pUA1041 (Km ^R)	Este trabajo
IC 185	WP2, <i>lamB</i> ⁺	M. Blanco
IC 186	WP2, <i>lamB</i> ⁺ / pKM101 (Ap ^R)	M. Blanco
IC 187	WP2, <i>uvrA</i>	M. Blanco
IC 188	WP2, <i>uvrA</i> / pKM101 (Ap ^R)	M. Blanco
IC 202	WP2, <i>lamB</i> ⁺ , ΔoxyR30 / pKM101 (Ap ^R)	M. Blanco
IC 203	WP2, <i>lamB</i> ⁺ , <i>uvrA</i> , ΔoxyR30 / plásmido pKM101 (Ap ^R)	M. Blanco
IC 3993	WP2, <i>lamB</i> ⁺ , $\Delta\text{umuDC::cat}$, <i>mutY::Kan</i> ; (Km ^R)	M. Blanco
IC3993 / pKM101	WP2, <i>lamB</i> ⁺ , $\Delta\text{umuDC::cat}$, <i>mutY::Kan</i> / pKM101 (Ap ^R)	Este trabajo
Za700	<i>trpE65</i> , <i>uvrA135</i> , <i>malB15</i> , <i>ton-11</i> , <i>sulA1</i> , $\Delta\text{lacU169}$, $\Delta\text{soxRS901}$, <i>zfc2204::l0km</i>	T. Kato
Za700 / pKM101	Za700 / pKM101 (Ap ^R)	Este trabajo

MATERIAL Y MÉTODOS

Debemos advertir que sólo son descritos los títulos de los protocolos y métodos empleados más relevantes, mas no está el detalle cada uno de ellos.

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 los Cuadros 1, 2 y 3, donde se incluyen sus características más relevantes, y su procedencia. Se ha empleado el sistema de nomenclatura recomendado por Demerec y col. (1966).

2. ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS

2.1. Ensayo de Retromutación en *S. enterica* Serov. Typhimurium. 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⁺ inducidos por el trata-

miento con agentes químico o físicos (Maron y Ames, 1983; Mortelmans, *et al.* 2000). Los resultados pueden expresarse cuantitativamente de distintas formas, la que se ha optado en este trabajo es la expresada como índice mutagénico (IM).

$$\text{IM} = \frac{\text{Número de Revertientes de la muestra problema}}{\text{Número de Revertientes del control negativo}}$$

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*.

Es un sistema de ensayo de retromutación en el que se cuantifica la reversión a *Trp*⁺, utilizándose la cepa WP2 de *E. coli*, así como otras derivadas de ella (Mortelmans, 2000). El procedimiento experimental a seguir para la realización de este ensayo es muy similar al indicado anteriormente para *S. enterica* Typhimurium.

3. MÉTODOS GENÉTICOS DE TRANSFERENCIA GENÉTICA

Conjugación Biparental / Electroporación.

4. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE DNA

Purificación de DNA Plasmídico / Purificación de DNA Cromosómico / Electroforesis de DNA / Digestión de DNA con enzimas de restricción (*Maniatis et al.* 1982).

5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Este protocolo requiere el empleo de cebadores complementarios a las cadenas opuestas de DNA y que estén orientados, con lo cual la extensión del cebador procede del 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

Cuadro 4
Relación de cebadores empleados en la ejecución del presente trabajo

Cebadores (Roche)	Nº de Bases	Secuencia	Posición	Aplicación
UvrB up RV	19	5' - <i>gat atc</i> 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' - <i>gat atc</i> 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' - <i>gat atc</i> 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' - <i>gat atc</i> 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' - <i>aag ctt</i> 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' - <i>aag ctt</i> 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

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). Los cebadores empleados aparecen descritos en el Cuadro 4.

6. LIGACIÓN DE DNA

Este tipo de procedimiento tiene por objeto lograr

moléculas recombinantes de DNA. Los productos de PCR recuperados presentan terminales con adeninas, las cuales son aprovechadas para el empleo del vector de clonación pGEM[®]-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). Para ligar los productos de PCR al vector pGEM[®]-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:

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

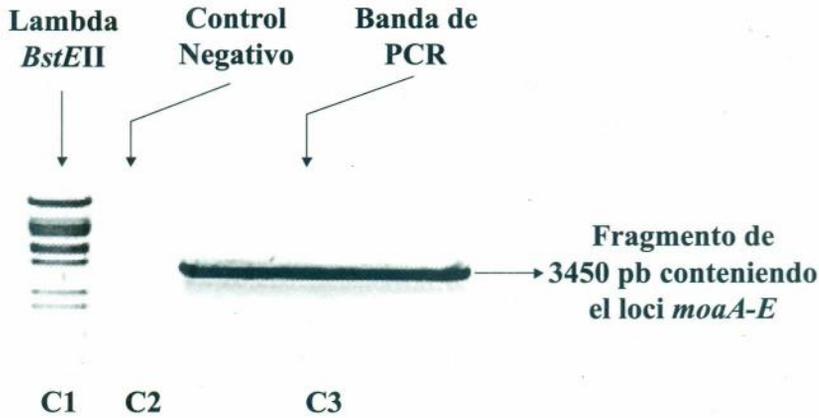


Figura 1. Electroforesis mostrando el fragmento de PCR conteniendo el operón *moa* de *S. enterica* Typhimurium Lt2

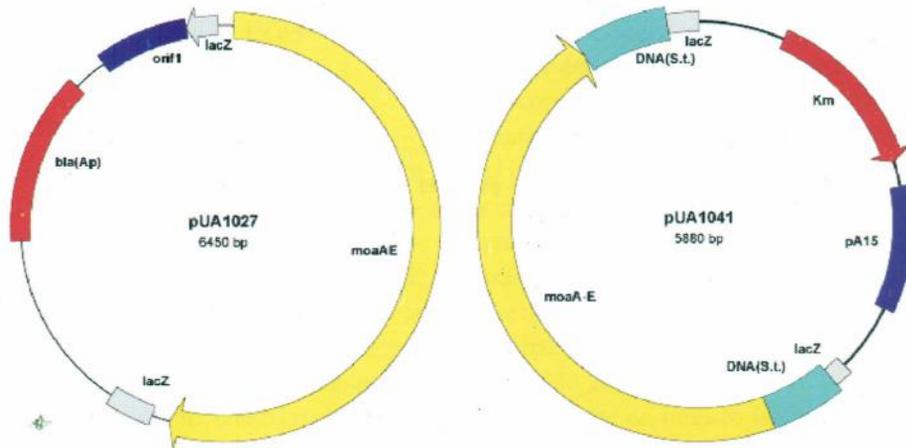


Figura 2. Esquema del plásmido pUA1027 (producto de la ligación del fragmento conteniendo el operón *moa* en el vector pGEM[®]-T) y plásmido pUA1041 (producto de la ligación del fragmento conteniendo el operón *moa* en el vector pK184)

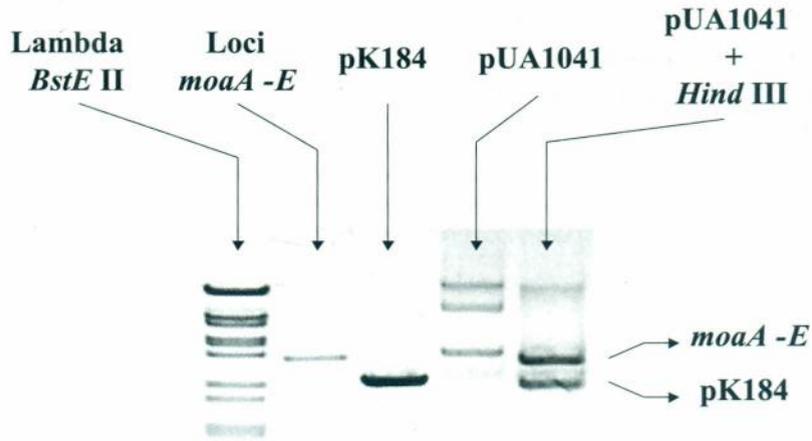


Figura 3. Electroforesis mostrando la liberación del operón *moa* del plásmido pK184, mediante digestión con *Hind*III del plásmido pUA1041

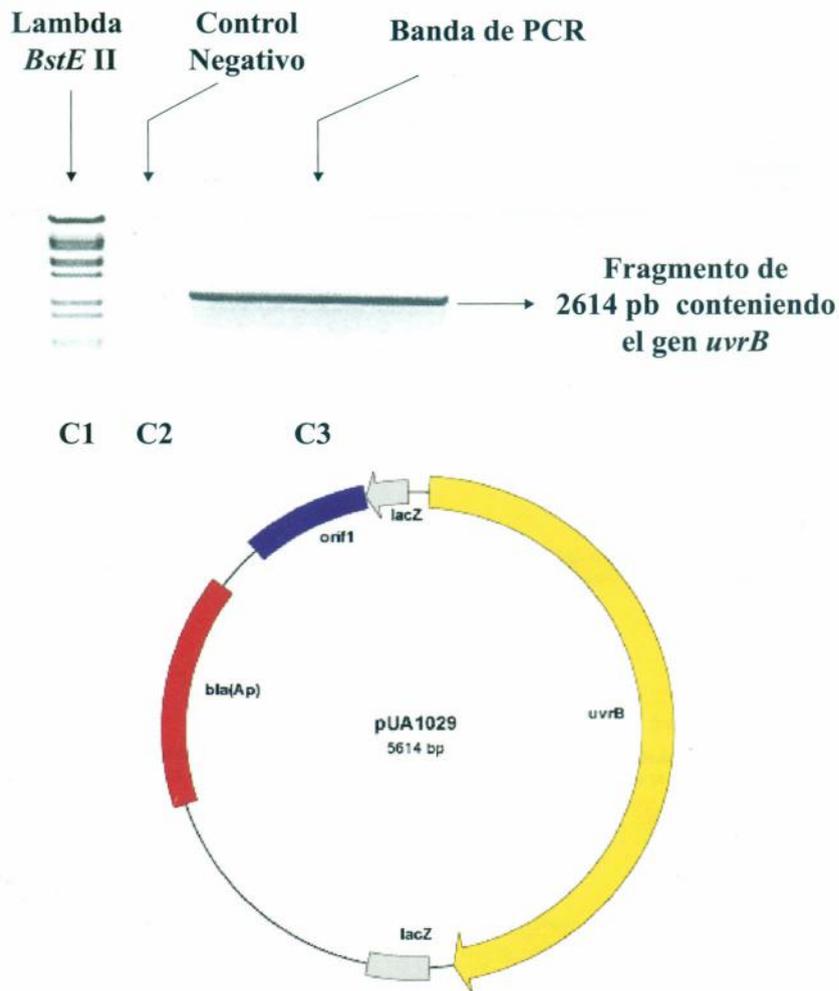


Figura 4. Electroforesis mostrando el fragmento de PCR conteniendo el gen *uvrB* de *S. enterica* Typhimurium LT2 y representación esquemática del plásmido pUA1029, producto de la ligación del fragmento conteniendo el gen *uvrB* en el vector pGEM[®]-T

7. RECUPERACIÓN Y PROCESAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA

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. La etapa posterior fue 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). Posteriormente fue necesario: Obtención de Extremos Romos de Fragmentos de DNA. / Mezcla de dNTPs para obtener extremos romos. / Defosforilación de Extremos Romos.

8. SECUENCIACIÓN DE DNA

La secuenciación de los distintos fragmentos de DNA se efectuó a través del empleo del kit *fmol*[®] DNA Cycle Sequencing System, de Promega. Este kit se fundamenta en el método de dideoxi de finalización de cadena. 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.

RESULTADOS

1. REQUERIMIENTOS GENÉTICOS EN LA MUTAGÉNESIS INDUCIDA POR CIPROFLOXACINA

1.1. Requerimiento del operón *Moa*

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, podría 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*, 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 1), flanqueado por las dianas *Eco RV* y se ligó al vector pGEM[®]-T, con lo que se obtuvo el plásmido pUA1027 (Figura 2). Dicho plásmido fue posteriormente introducido en las cepas elegidas de *S. enterica* Serov. Typhimurium.

Paralelamente a este trabajo, y dado que el vector pGEM[®]-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[®]-T, resultando el plásmido recombinante pUA1042. Este último (previa electroporación en DH5[®]) y paralelamente con el vector pK184, son digeridos con la enzima *Hind III* para luego lograr la construcción del plásmido recombinante pUA1041 (Figura 2), cuya comprobación de la construcción se demuestra en la Figura 3.

Las cepas elegidas para la introducción de los plásmidos construidos fueron aquellas que presentaban una menor deleción 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.

Cuadro 5
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 ($\mu\text{g/placa}$)						
		0	0,00325	0,00612	0,0125	0,025	0,05	0,1
TA2659 (hisG428)	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

Cuadro 6
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 ($\mu\text{g/placa}$)						
		0	0,0032	0,0061	0,0125	0,025	0,05	0,1
TA104 (hisG428 / 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	0	1,63	1,71	1,94	1,85	1,31	0,39
UA1817 (TA104 / pK184)	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
UA1819 (TA104 / pUA1041)	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

Una vez obtenido las cepas deseadas (TA104 y TA2659/pUA199) se les introdujeron las construcciones realizadas en los vectores pGEM[®]-T y pK184 y las cepas resultantes se utilizaron para estudiar el papel del operon *moa* en la mutagénesis debida a ciprofloxacina. En el Cuadro 5 se presentan los resultados obtenidos con la cepa TA2659. En dicha tabla puede observarse que la presencia del plásmido pUA199 junto al vector pGEM[®]-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[®]-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 el Cuadro 6, 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=2,26) niveles de mutagénesis similares a los de la cepa TA104/pUA1041 (UA1819, IM=1,79).

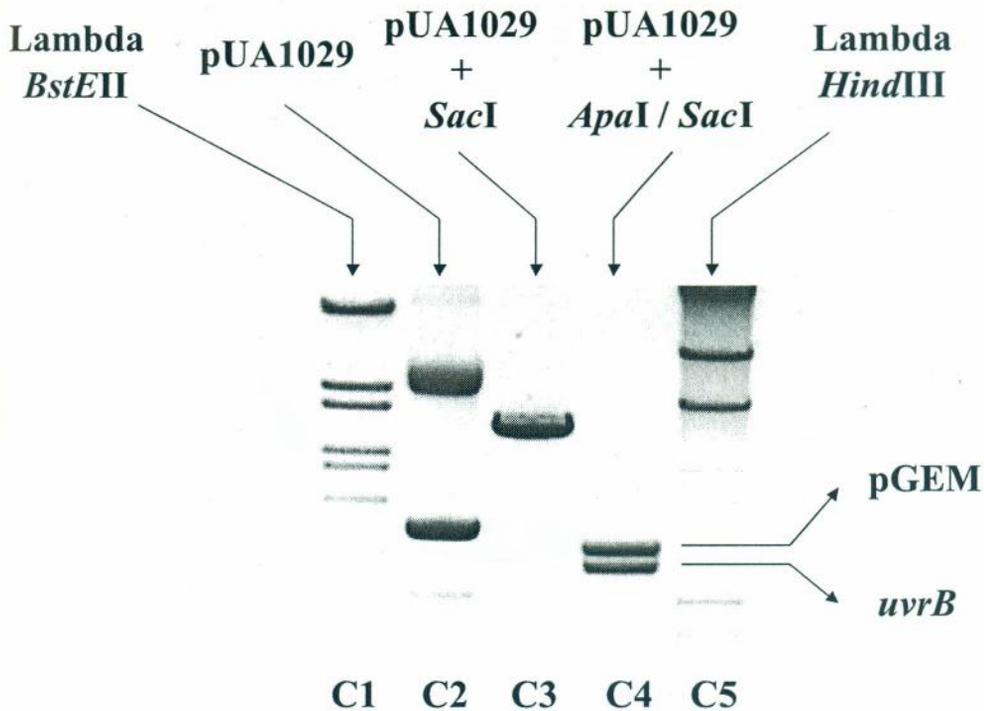


Figura 5. Electroforesis mostrando la liberación de fragmento *uvrB* del pGEM[®]-T, mediante digestión con *ApaI / SacI* del plásmido pUA1029

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 $\Delta uv r B$ 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*, a partir del DNA cromosómico de *S. enterica* Serov. Typhimurium LT2. Para ello se diseñaron los cebadores UvrB up *EcoRV* a -558 pb del inicio del CDS de *uvrB* y UvrB rv *EcoRV* a +2055 pb del inicio del CDS de *uvrB*, que proveyó un fragmento de DNA de 2614 pb conteniendo al gen *uvrB* que, a la vez incluía las dianas de restricción para *EcoRV* (Figura 4). Este fragmento se ligó

al vector de clonación pGEM[®]-T, denominándose en adelante plásmido pUA1029 (Figura 4). De esta construcción se recuperó el fragmento conteniendo el gen *uvrB* mediante digestión con *SphI* y *SacI* (Figura 5), que posteriormente se ligó al vector pK184, previa digestión de este último también con *SphI* y *SacI*, dando origen a la obtención del plásmido pUA1040 (Figura 6). Una vez obtenida la construcción deseada, se introdujo en la cepa TA104 mediante electroporación (cepa UA1818), comprobándose su fenotipo Uvr⁺, irradiando dicha cepa, junto con los controles adecuados con diferentes dosis de radiación UV (Figura 7). Con la cepa obtenida se abordaron los estudios de mutagénesis a diferentes dosis de ciprofloxacina.

Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 7, en la cual puede apreciarse que la complementación de la mutación *uvrB* (TA104/pUA1040) provoca un mayor aumento del índice de mutagénesis del orden del 3,08 a una concentración de 0,025 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).

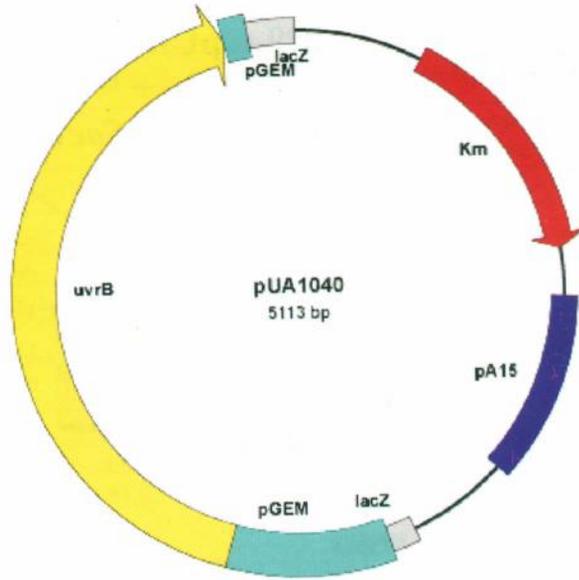


Figura 6. Representación esquemática del plásmido pUA1040, producto de la ligación del fragmento conteniendo el gen *uvrB* en el vector pK184

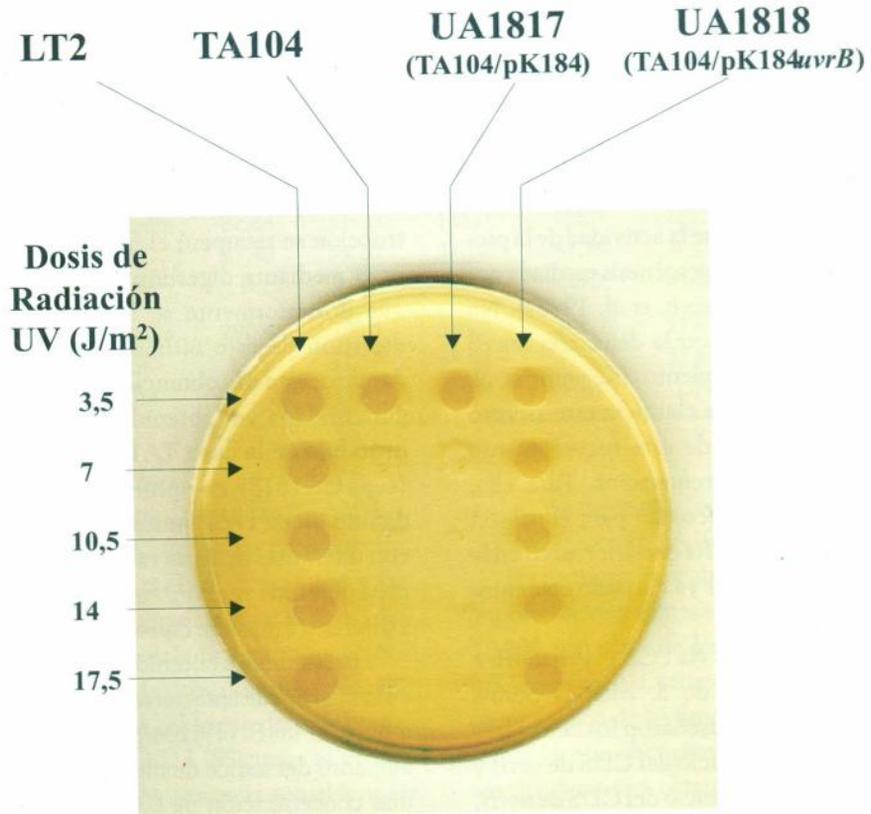


Figura 7. Placa mostrando la sensibilidad a la radiación UV de las construcciones UA1817 y UA1818

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 el Cuadro 8, 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 en la Figura 8, la cepa defectiva en *UvrA* únicamente es capaz de ser mutable por dicho antimicrobiano a una concentración muy baja (0,00612 g/placa); a concentraciones superiores a 0,012 g/placa provocan mortalidad celular.

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 están dirigidos a profundizar en los mecanismos de mutagénesis de esta familia de antibacterianos.

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 com-

Cuadro 7
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 (µg/placa)						
		0	0,0032	0,0061	0,0125	0,025	0,05	0,1
TA104 (hisG428 /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
UA1817 (TA104 / pK184®)	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
UA1818 (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

Cuadro 8
Efecto del gen *uvrA* sobre la mutagénesis debida a la ciprofloxacina en cepas del sistema *E. coli* Wp2

Cepas		NÚMERO DE REVERTIENTES POR PLACA						
		Concentración de Ciprofloxacina (µg/placa)						
		0	0,00325	0,00612	0,0125	0,025	0,05	0,1
IC186 (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
IC188 (WP2, <i>uvrA</i> / 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

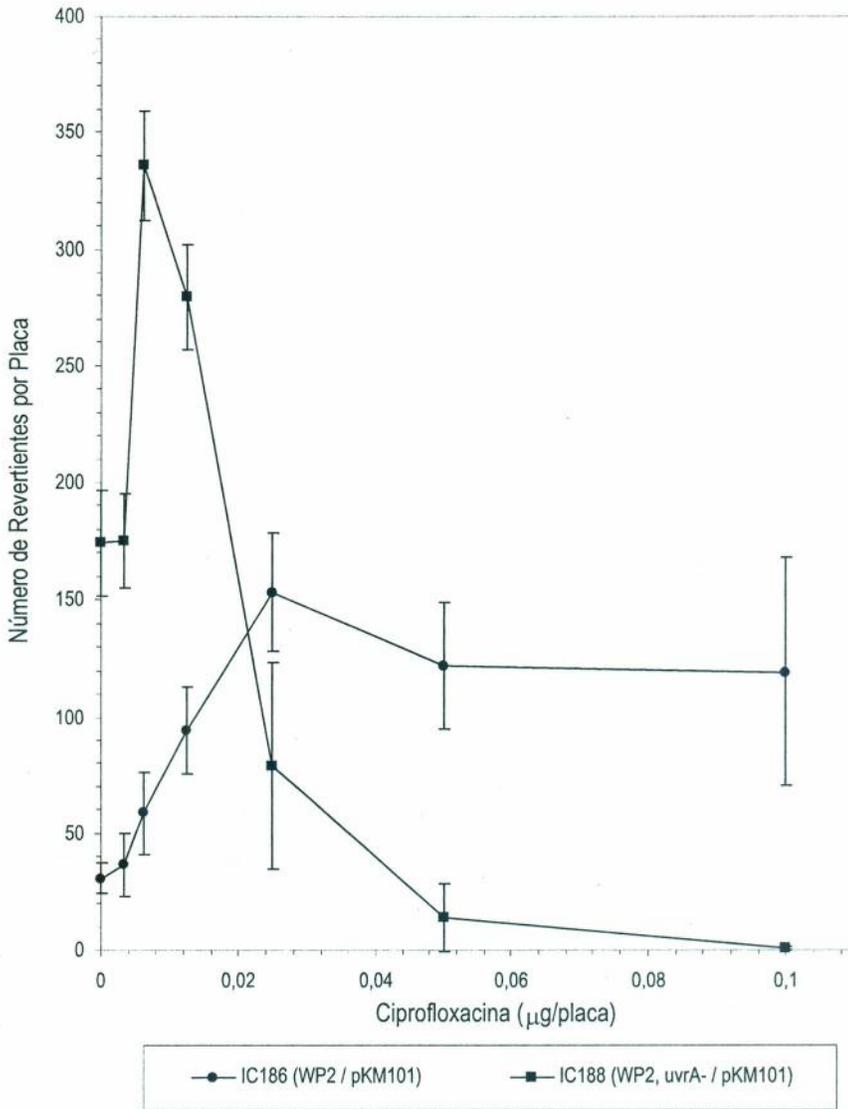


Figura 8. Número de revertientes por placa a diferentes dosis de ciprofloxacina, en cepas *uvrA*⁻ y *uvrA*⁺ de *E. coli* WP2

pletamente la aparición de mutagenésis (Pidcock 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, deben presentar el operon *mucAB*, a través de los plásmidos pUA199 o pKM101 (Hartman, *et al.* 1986; Pidcock 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, está bien documentado que no condiciona esta mutagenésis; la cual es atribuida a cualquiera de las hipótesis señaladas en la parte introductoria (Clerch, 1996a; 1996b). Todo ello indica que el principal mecanismo de mutagenésis por quinolonas es dependiente de los genes *mucAB* y/o posiblemente de 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 cuestiona-

do seriamente de que el sistema NER sea requerido para que las quinolonas sean mutagénicas. De entre los diversos genes delecionados, 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 Δ *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* (Cuadro 6). 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, se considera que este tipo de anomalías genómicas en estas cepas de ensayo de retromutación, no le restan validez al sistema para 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 deleción de otros genes diferentes al *uvrB* pueden tener trascendencia. Frente a ello, se debe también considerar la posibilidad de que otros genes delecionados con función desconocida, así como los tres localizados entre STM 1490-1492, todos ellos genes hipotéticos 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 (Cuadro 6).

Los primeros resultados sobre la mutagénesis producidos por estos compuestos ya mostraron que las quinolonas no inducían mutagénesis en cepas mutantes Δ *uvrB*

(Inman, *et al.* 1983; Maron y Ames, 1983), aduciendo en su momento que las dianas ensayadas no eran las apropiadas para la detección mutagénica. Más 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 sólo deberse al tipo de diana mutacional, sino también 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*⁺) 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*⁺ reforzó dicha hipótesis; aunque no 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 *hoi 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* (Cuadro 8 y Figura 8).

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.

cas, 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 Tyr¹²² 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, se observa que el 8-metoxipsoraleno produce revertientes al triptófano en células Uvr⁺, pero no en células Uvr⁻ de *E. coli*; aunque Yatagai y col, también detectan mutaciones en células Uvr⁻ 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⁻, 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 precisarse que esta conclusión es sólo aparente, ya que los entrecruzamientos son mutagénicos, pero solo en células Uvr⁺. 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 implican entrecruzamientos intercatenarios y dos lesiones cercanas y opuestas (o lesiones opuestas no adyacentes) han resultado atractivas, porque proveen 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 que 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⁺. 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⁺* (Cuadro 7). Resultados similares frente a otros de supervivencia han 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⁻* y *uvrA⁺* (Cuadro 8, Figura 8) muestran 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.

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, en la mayoría de los casos se utilizaron dosis de selección elevadas.

Parece lógico 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* poseen elementos reguladores para un sistema SOS funcional; y contienen, 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 está ausente en *S. pneumoniae* (Gasc, *et al.* 1980), se ha descrito un operón del transposon conjugativo Tn5252 que confiere una reparación mutagénica inducida por UV en el neumococo y *E. faecalis* (Muñoz-Najar y Vijayakumar, 1999).

En función de los resultados presentados en este documento y de las consecuencias que puede tener la exposición de las poblaciones de patógenos a bajas dosis de quinolonas, la evaluación de esta familia de antimicrobianos 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.

CONCLUSIONES

1. El operón *moa* involucrado en la biosíntesis de cofactores de molibdeno, próximo a la región *uvrB* delecionada en diferentes cepas de *S. enterica* Serov. Typhi-

murium, 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. 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.

4. 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.

Agradecimientos

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Barcelona por haber hecho posible la ejecución del presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ames, B. y 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. y D. Boxer. 2000. ModE-Depend Molybdate Regulation of the Molybdenum Cofactor Operon *moa* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* Dec.: 7034-7043.
- Ataya, F. 2001. Análisis Molecular de la Proteína Portadora del cofactor de Molibdeno de *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- 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. y A. Martínez. 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. Martínez. 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.
- Cebula, T. y W. Koch. 1990. Sequence Analysis of *Salmonella typhimurium* Revertants. *Mutation and the Environmental*. Part D. Wiley, Liss.: 366-377.
- 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. y M. Llagostera. 1992. The role of the excision and error-prone repair systems in mutagenesis by fluorinated 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 Antimicrobianos. *Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Barcelona*.
- Clerch, B.; Bravo, J.M. y M. Llagostera. 1996a. Analysis of the Ciprofloxacin Induced Mutations in *Salmonella typhimurium*. *Environmental and Mutagenesis* 27: 110-115.
- Clerch, B.; Bravo, J.M. y 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. y M. Llagostera. 1996c. Identification of a pKM101 Región Which Confers a Slow Growth Rate and Interferes with Susceptibility to Quinolone in *Escherichia coli* AB1157. *Journal of Bacteriology*. Oct.: 5568-5572.
- Cohen-Fix, O. y Z. Livneh. 1992. Biochemical analysis of UV mutagenesis in *Escherichia coli* by using a cell-free reaction coupled to a bioassay: Identification of a DNA repair-dependent, replication-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol.80: 3300-3304.
- De Marini, D. 2000. Influence of DNA repair on mutation spectra in *Salmonella*. *Mutation Research*. 450: 5-17.
- Dronker, M. y R. Kanaar. 2001. Repair of DNA interstrand crosslinks. *Mutation Research*. 489:217-247.
- Durbach S.; Anderson, S. y 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.
- Eisentadt, E.; Miller, J.; Kahng, L. y W. Barnes. 1989. Influence of *uvrB* and pKM101 on the spectrum of spontaneous, UV-and-ray-induced base substitutions that revert *hisG46* in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*. 210: 113-125.
- Gasc, M.; Sicard, N.; Clavery, J. y A. Sicard. 1980. Lack of SOS repair in *Streptococcus pneumoniae*. *Mutation Research*. 70: 157-165.
- Gocke, E. 1991. Mechanism of Quinolone mutagenicity in bacteria. *Mutation Research*. 248: 135-143.
- Hartman, P.; Ames, B.; Roth, J.; Barnes, W. y D. Levin. 1986. Target Sequences for Mutagenesis in *Salmonella* Histidine-Requiring Mutants. *Alan R. Liss, Inc.*: 632-641.
- Inman, M.; Butler, MA. Connor, TH, y TS, Matney. 1983. The effects of excision repair and the plasmid pKM101 on the induction of *his*⁺ revertants by chemical agents in *Salmonella typhimurium*. *Teratog. Carcinog. Mutagen*. 3(6): 491-501.
- Joshi, M.; Johnson, J. y K. Rajagopalan. 1996. Molybdenum Cofactor Biosynthesis in *Escherichia coli mod* and *mog* Mutants. *Journal of Bacteriology*. July.: 4310-4312.
- Koch, W.; Henrikson, E. y T. Cebula. 1996. Molecular Analysis of *Salmonella hisG428* ochre revertants for rapid characterization of mutational specificity. *Mutagenesis*. Vol. 11, N°4: 341-348.
- Kozmin, S.; Pavlov, Y.; Dunn, R. y R. Schapaper. 2000. Hypersensitivity of *Escherichia coli* $\Delta(uvrB-bio)$ Mutants to 6-hydroxylaminopurine and Other Base Analogs Is Due to a Defect in Molybdenum Cofactor Biosynthesis. *Journal of Bacteriology*. June: 3361-3367.
- Kunz, B. y 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.
- Kuzminov, A. 1999. Recombinational Repair of DNA Damage in *Escherichia coli* and Bacteriophage. *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. y 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. y 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. y B. Ames. 1984. Spontaneous and mutagen-induced deletions: Mechanistic studies in *Salmonella* tester strain TA102. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (81): 4457-4461.
- Mamber, S.; Kolek, B.; Brookshire, K.; Bonner, D. y J. Fung-Tome. 1993. Activity of Quinolones in the Ames *Salmonella* TA102 Mutagenicity Test and Other Bacterial Genotoxicity Assays. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. Feb.: 213-217.
- Maniatis, T.; Fritsch, E. y K. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Maron, D. y B. Ames. 1983 - Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*. 113: 173-215.
- Martínez, A.; Urios, A. y M. Blanco. 2000. Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in

- OxyR, and its *oxyR*⁺ parent WP2 *uvrA/pKM101*: detection of 31 oxidative mutagens. *Mutation Research*. 467: 41-53.
- Maupin-Furlow, J.; Rosentel, J.; Ho Lee, J.; Deppenmeier, U.; Gunsalus, R. y K. Shanmugam. 1995. Genetic Analysis of the *mod*ABCD (Molybdate Transport) Operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Sept.: 4851-4856.
- Mizrahi, V. y S.J. Anderson. 1998. DNA Repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence?. *Mol. Microbiol.* 29: 1331-1339.
- Mortelmans, R. y E. Riccio. 2000. The Bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutation Research*. 455: 61-69.
- Muñoz-Najar, U. y 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.* 1: 347-352.
- 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.
- Philips, I.; Culebras, E.; Moreno, F. y F. Baquero. 1987. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J. of Antimicrobial Chemotherapy*, 20: 631-638.
- Piddock, L. y 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. y 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.
- Porwollik, S.; Mei-Yi Wong, R.; Sims, S.; Schaaper, R.; DeMarini, D. y M. McClelland. 2001. The Δ *uvrB* mutations in the Ames strains of *Salmonella* span 15 to 119 genes. *Mutation Research*. 483: 1-11.
- Ramos, I.; Lipman, R.; Tomasz, M. y A. Basu. 1998. The major Mitomycin C-DNA Monoadduct is Cytotoxic but not Mutagenic in *Escherichia coli*. *Chem. Res. Toxicol.* 11:64-69.
- Rosentel, J.; Healy F.; Maupin-Furlow, J.; Ho Lee, J. y 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.
- Shen, L.; Mitscher, L.; Sharma, P.; O'Donnel, T.; Chu, D.; Cooper, C.; Rosen, T. y 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. 2^{da} Edic. 77-95.
- Slader, F.; Melian, A. y 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. y M. Skavronskaya. 1992. Effect of plasmid pKM101 in ultraviolet irradiated *uvr*⁺ and *uvr*⁻ *Escherichia coli*. *Mutation Research*. Nov. 16;270(2): 145-149.
- Svoboda, D.; Smith, C.; Stephan, J.; Taylor, A. y 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.
- Watanabe, K.; Sakamoto, K. y T. Sasaki. 1998a. Comparisons 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. y K. Kawakami. 1998b. Comparisons 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.
- Ysern, P.; Clerch, B.; Castaño, M.; Gibert, I.; Barbe, J. y M. Llagostera. 1990. Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. *Mutagenesis*. Vol.5, N°1: 63-66.
- Zhao, X. y K. Drlica. 2002. Restricting the selection of Antibiotic-Resistant Mutant Bacteria: Measurement and potential Use of the Mutant Selection Window. *The Journal of Infectious Diseases*. 185: 561-565.