

Tesis de Posgrado

Resistencia bacteriana a Amikacina

Marini, Patricia E.

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Marini, Patricia E. (1989). Resistencia bacteriana a Amikacina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2256_Marini.pdf

Cita tipo Chicago:

Marini, Patricia E. "Resistencia bacteriana a Amikacina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2256_Marini.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"Resistencia Bacteriana a Amikacina"

Autor: Patricia E. Marini
Director: Marcelo Eduardo Tolmasky
Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas
"Fundación Campomar"

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas.
Año 1989

- 2.256 -
Ej: 2

A Guillermo

A Nicolás

AGRADECIMIENTOS

Ante la imposibilidad de mencionar a todos aquellos a quienes quisiera agradecer, recuerdo especialmente:

- al Instituto de Investigaciones Bioquímicas - "Fundación Campomar" en la persona de sus directivos por permitirme hacer este trabajo. A todo su personal por su cordialidad y su trabajo, especialmente a Soledad Gimenez, Margarita Mazzardi, Beyle Wolf y Aída Pelman. A la subcomisión de doctorado por facilitarme enormemente los trámites.

- a Norberto Mallarini por las figuras y la simpatía.

- a Sergio Trombetta, Miguel Ballicora y Juan Robertson por su gran ayuda con la computadora.

- a mis queridos compañeros de camada Eduardo Guillén, Graciela Bocaccio y Horacio Nasti.

- a los Dres. Ugalde y Ielpi por soportar sin reproches mi constante presencia en sus laboratorios

- a aquellos con quienes compartí los mejores y peores momentos: Viviana Lepek, Maia Bosh, Sonia Cavagnac, Dr. A. J. Parodi, Alejandro Petroni, Cristina Bertinetti, Alejandra Raimondi, Toni Uttaro, Silvia Moreno, Susana Giambiaggi, Marcela Ferraro, Mariana Resnicoff, Silvia Curuchet, Nora Iñón y Roberto Geremía.

- a los amigos: Angeles Zorreguieta, Olga Castro, Marcelo Tolmasky, Mariana Stein, Tony Coira, Manuel Gidekel, Diana Tolmasky y Juan José Miret.

- a las Dras. Clara Krisman y Marta Risotto por impulsarme a iniciar este camino.

- a la Dra. Delia Alvarez por despertarme el interés por la investigación

- al Dr. Staneloni por su indispensable ayuda, particularmente durante estos últimos meses, por los amistosos consejos y por la "Historia" del Instituto.

- a mis amigas Patricia Vives y Silvia Altabe por comprenderme siempre.

- a mis padres y hermana por su apoyo moral y material al cumplimiento de cada uno de mis propósitos.

- al MAESTRO, Dr. Marcelo E. Tolmasky, por todo.

- a todos aquellos que a pesar de no figurar en esta lista tengo muy presentes

INDICE

	Página
<u>RESUMEN</u>	1
<u>I- INTRODUCCION.</u>	2
I-1. Antibióticos.	2
I-1.1. Aminoglicósidos.	4
I-1.1.1. Estructura.	5
I-1.1.2. Ingreso a la célula.	7
I-1.1.3. Mecanismo de acción.	10
I-1.1.4. Amikacina.	12
I-1.2. Resistencia a aminoglicósidos.	14
I-1.2.1. Alteración de la afinidad por el ribosoma.	15
I-1.2.2. Inhibición del ingreso a la célula.	15
I-1.2.3. Modificación enzimática.	16
I-1.3. Resistencia a aminoglicósidos mediada por plásmidos.	17
I-2. Elementos transponibles.	19
I-2.1. Secuencias de inserción y transposones compuestos.	22
I-2.2. Bacteriófago Mu.	24
I-2.3. Familia Tn3.	28
I-2.4. Mecanismo de transposición.	33
I-3. Evolución de resistencia a aminoglicósidos.	35
<u>II-MATERIALES Y METODOS.</u>	36
II-1. Bacteriología.	36
II-1.1. Microorganismos y condiciones de cultivo.	36
II-1.2. Preparación de extractos de <i>E. coli</i> .	38
II-1.3. Conjugación.	39
II-1.4. Transformación	39
II-1.5. Minicelulas	39
II-2. ADN.	40
II-2.1. Aislamiento de plásmidos.	40
II-2.2. Tratamientos enzimáticos.	41
II-2.3. Electroforesis en gel de agarosa (EGA).	41
II-2.4. Transferencia de ADN a papel de nitrocelulosa.	41
II-2.5. Preparación de sondas radioactivas.	42
II-2.6. Hibridación.	42
II-3. Proteínas.	43
II-3.1. Determinación de enzimas modificadoras de aminoglicósidos.	43
II-3.2. Cromatografía de intercambio aniónico.	44
II-3.3. Cromatografía de afinidad.	44
II-3.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).	44
II-3.5. Determinación de proteínas.	44

III- <u>OBJETIVOS</u>	45
IV- <u>RESULTADOS Y DISCUSION.</u>	46
IV-1. Antecedentes relacionados a resistencia a amikacina.	46
IV-2. Aislamiento de pMET1.	47
IV-3. Resistencia a antibióticos codificada por pMET1.	49
IV-4. Resistencia a amikacina.	53
IV-5. Enzima inactivadora de aminoglicósidos.	60
IV-6. Identificación de AAC(6').	66
IV-7. Caracterización del plásmido pMET1.	75
IV-7.1. Mapa de restricción.	75
IV-7.2. Comparación física entre pMET1 y Tn3	79
IV-7.2.1. <i>mpA</i>	82
IV-7.2.2. <i>mpR</i>	82
IV-7.2.3. <i>bla</i>	86
IV-7.3. Comparación de pMET1 con pJHCMW1.	86
IV-8. Aislamiento del transposón Tn1331.2	97
IV-9. Complementación de transposasas de Tn3 y Tn1331.	106
IV-10. Amplificación.	115
V- <u>CONCLUSIONES.</u>	122
VI- <u>CITAS</u>	124
<u>ABREVIATURAS</u>	133

RESUMEN

Se ha aislado un plásmido conjugativo, pMET1, portador de determinantes genéticos para resistencia a Ak, a partir de cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* provenientes de una epidemia en el Hospital Lagomaggiore de la ciudad de Mendoza. A partir de este plásmido se aisló un transposón, Tn1331.2, que contiene los genes responsables de conferir resistencia a Ap, Ak, Km, Sm y Tm. Se determinó que la resistencia a Ak, Km, y Tm se debe a la acción de una 6'-N-acetiltransferasa, codificada por un gen *aac* presente en Tn1331.2, que se identificó como una proteína de 26 kD. Este transposón se clasificó como perteneciente a la familia de transposones Tn3, subgrupo Tn3, y se demostró que es prácticamente idéntico a otro transposón, Tn1331, aislado previamente (176). Tn1331.2 difiere de Tn1331 únicamente en que contiene una duplicación de un fragmento de ADN que comprende a los genes responsables de resistencia a Ak, Km, Sm y Tm (genes *aac* y *aad*). Se ha demostrado que la relación entre Tn3, Tn1331 y Tn1331.2 es muy estrecha, sugiriendo un mismo origen evolutivo.

I-INTRODUCCION

I-1. Antibióticos.

Antiguamente, *Homo sapiens* y sus predecesores luchaban contra un enemigo ubicuo e invisible, las bacterias. Probablemente la evidencia mas temprana de farmacología fue un emplasto de flores y hierbas que se encontró junto a un hombre de Neanderthal enterrado hace 50.000 años y demostró tener una leve actividad antibacteriana. Existen evidencias del uso de antibacterianos naturales en prácticamente todas las civilizaciones antiguas, como Mesopotamia, Egipto, Roma, China (118).

Científicamente la quimioterapia, es decir, el uso de agentes químicos que dañan microorganismos invasores sin perjudicar al huésped tiene una historia tan larga como la microbiología. Pasteur (1877) observó por primera vez la inhibición del crecimiento de ciertos microorganismos por productos que se difundían de otros microorganismos. Esto llevó a la aplicación de hongos o extractos de éstos directamente sobre heridas, con resultados variables (158).

Paul Ehrlich (1854-1915) sintetizó compuestos orgánicos de arsénico de alto efecto antimicrobiano, pero también muy tóxicos para el hombre. También examinó las propiedades de distintos colorantes en busca de "balas mágicas" capaces de asesinar exclusivamente a los organismos patógenos.

Un avance significativo de la quimioterapia ocurrió en 1928 cuando Alexander Fleming descubrió los efectos antibacterianos de un compuesto producido por *Penicillium notatum* y lo denominó **penicilina** (158). Sin embargo, recién diez años después, ante el éxito obtenido con las **sulfas**, comenzó a producirse penicilina comercialmente. Este antibiótico resultó de gran utilidad en el tratamiento de infecciones por bacterias aeróbicas Gram positivas (G(+)).

En 1939 Selman Waksman aisló **actinomicina**, en 1942 **estreptomicina**, y en 1943 **estreptomina** (Sm). El aislamiento de Sm, el primer aminoglicósido descubierto, reviste particular importancia por ser la primera droga no excesivamente tóxica, capaz de actuar contra bacterias Gram negativas (G(-)) y contra *Mycobacterium tuberculosis* (158). Waksman acuñó la palabra antibiótico.

Actualmente los químicos medicinales consideran como **antibióticos** (AB) a aquellos compuestos antibacterianos que provienen de una fuente natural, generalmente hongos, o que poseen una estructura molecular análoga a los antibacterianos naturales (166). Quedan por lo tanto fuera de esta definición aquellos antibacterianos totalmente sintéticos como sulfas (1932), nitrofuranos (1943) y quinolonas (1962), que se utilizan corrientemente en medicina humana y animal; sin embargo todos ellos son mencionados habitualmente como AGs.

A partir de 1942 el aislamiento de nuevos AB se hizo cada vez mas frecuente. Su uso ha ido aumentando en forma tal que han llegado a constituir entre el 15 y el 30% de todas las drogas terapéuticas vendidas (35). El porcentaje de AB expendidos es mucho menor en países desarrollados que en países en desarrollo (35).

La búsqueda de nuevos ABs, tanto por rastreo sistemático (49, 166) como por modificación química de antimicrobianos naturales ha provisto cientos de nuevas sustancias tóxicas para microorganismos (104). Estas pueden dividirse en seis grupos, de acuerdo al sitio bioquímico general sobre el que actúan (166), siendo modificadores de:

- a- biosíntesis de ácidos nucleicos
- b- biosíntesis de péptidoglicano
- c- biosíntesis de lípidos
- d- funciones ribosomales
- e- funciones de membranas
- f- metabolismo de ácido fólico

Para el uso medicinal de AB son de fundamental importancia:

* su **espectro de acción**, es decir, el conjunto de microorganismos contra los cuales es efectivo

* su **toxicidad selectiva**, dada por la capacidad de afectar al microorganismo sin modificar las funciones normales del organismo huésped

* conocer si su función es **bactericida o bacteriostática**, y a qué **concentración** alcanzan su efecto bactericida, ya que es necesario que alcance estos niveles en los **órganos infectados** para que su acción sea efectiva

* su comportamiento **farmacocinético**, que permite determinar la vía de administración y la dosificación adecuadas para mantener una concentración óptima de antibacteriano en el sitio de acción en todo momento. Este comportamiento comprende la capacidad y velocidad de absorción de la droga cuando se la administra por distintas vías, y su forma y rapidez de eliminación y/o degradación por el organismo huésped (136).

Además de estas características al elegir el AB a usar debe tenerse en cuenta el **antagonismo o sinergismo** que pueda presentar con otras drogas que se suministren simultáneamente al paciente. También se debe considerar la capacidad de los microorganismos involucrados para **desarrollar resistencia** contra el AB en cuestión (136).

A pesar del uso extensivo de ABs, las infecciones bacterianas continúan siendo la mayor causa de mortalidad y morbilidad en pacientes granulocitopénicos o con enfermedades terminales como cáncer (120). La situación se agrava al tener en cuenta que muchos pacientes adquieren infecciones bacterianas durante su estadía en un hospital; por ejemplo en Estados Unidos el 6% de los pacientes internados adquieren infecciones intrahospitalarias (166). Esta situación es mas grave en países en desarrollo.

El tiempo requerido para la identificación del agente bacteriano causante de una infección y su espectro de sensibilidad a ABs es de por lo menos dos días. Por lo tanto no se puede esperar estos resultados antes de comenzar la terapia, particularmente en el caso de neonatos y pacientes inmunodeprimidos (cáncer, transplantados, ancianos, SIDA), o de infecciones que desencadenan en la muerte como meningitis o septicemia (163, 166). En estos casos se recomienda el uso empírico de ABs (81).

Para ser efectivo en utilización empírica un AB debiera cubrir el mayor espectro posible, a pesar que la eliminación de parte de la flora normal del organismo pueda llevar a infecciones secundarias. Si se trata de una infección intrahospitalaria, la elección del o los ABs a utilizar en forma empírica debe basarse en el patrón de cepas resistentes de la institución en particular (155). El espectro bacteriano cubierto debe incluir a todas las especies que producen frecuentemente infecciones del tipo de la atacada en cada ocasión. A tales efectos, para infecciones intrahospitalarias en pacientes inmunodeprimidos, son combinaciones de elección aminoglicósido (AG) mas un AB β -lactámico, quinolona o cefalosporina (81, 87, 109, 120, 136, 155, 166). A pesar que continuamente se estudia la posibilidad de emplear un solo AB en estos casos la combinación de ABs (siendo uno de ellos un AG) continúa siendo la opción mas utilizada, tanto por su efectividad como por su costo (97), y por el efecto sinérgico que presentan ciertos AGs con quinolonas (43, 70), β -lactámicos (10, 30) y lipopéptidos cíclicos (52, 157).

El mayor éxito de los ABs ha sido su capacidad de controlar el desarrollo de las bacterias y en grado menor de los hongos patógenos. Ciertos ABs tienen también posibles aplicaciones como agentes antitumorales. En el caso de infecciones por protozoos y virus todavía no se conocen ABs efectivos.

I-1.1. Aminoglicósidos.

Bajo esta denominación se agrupa a diversos ABs que tienen algunas características químicas comunes y acciones farmacológicas semejantes. Se han caracterizado más de 150 AGs, y más de diez de ellos se han desarrollado comercialmente para uso terapéutico (47).

La mayoría de estos compuestos son producidos por actinomicetes del género *Streptomyces*, por *Micromonospora* o por *Bacillus* (104, 109). Estos microorganismos producen conjuntamente gran cantidad de sustancias que pueden causar hipersensibilidad alérgica y efectos tóxicos. De allí la importancia de procedimientos de producción industrial que permitan la mayor purificación posible de los ABs (136).

Se cree que los genes responsables de conferir resistencia a ABs existen en la naturaleza anteriormente a la utilización de esas sustancias como antibacterianos. Por lo tanto, con el fin de disminuir la aparición de cepas resistentes, se intentó modificar químicamente a los ABs naturales, creyendo que no existirían genes que codifiquen resistencia a compuestos naturalmente inexistentes. Aparecieron así los ABs semisintéticos, derivados de antimicrobianos naturales por modificación química (49). Son AGs de este tipo netilmicina y amikacina (Ak) (94, 104).

La semejanza entre las estructuras químicas de los AGs les confiere propiedades análogas con respecto a su mecanismo de acción antibiótica, destino en el organismo y reacciones adversas. Pero las diferencias entre unos y otros son suficientes para dar lugar a distintas aplicaciones terapéuticas (109).

Los AGs son ABs de amplio espectro, que actúan contra bacterias G(+) y G(-). Esta fue la gran ventaja de Sm sobre penicilina, el único AB conocido previamente, que actuaba solamente sobre bacterias G(+). Esta ventaja llevó a una utilización exhaustiva de Sm, a pesar de sus efectos tóxicos al emplearla en grandes dosis o en tratamientos prolongados. En 1949 apareció la neomicina (Nm), AB muy potente, pero de uso limitado a piel y mucosas por su elevada toxicidad (104). Entre 1950 y 1960 el uso de AGs se limitó casi exclusivamente a kanamicina (Km) que, con menor potencia como AB y menor toxicidad que la Nm, resultaba efectiva contra una variedad de infecciones. Tanto Km como Nm eran ineficientes contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia sp.*, y su capacidad de actuar contra *Klebsiella sp* disminuía con el tiempo (104), por la aparición de cepas resistentes. En 1963 se descubrió la gentamicina (Gm), de espectro de acción mayor que los AGs anteriormente conocidos. Con ella aumentó el uso de este tipo de ABs y también la incidencia de cepas bacterianas resistentes a ellos (104). En 1972 Kawaguchi sintetizó Ak (94) por modificación química de Km. El nuevo AG resultó tener el mayor espectro de acción de todos y ser el más refractario a inactivación por enzimas que confieren resistencia a AGs (155).

La combinación de muchos AGs con penicilinas (10, 29, 30), polimixina, cefalosporinas y quinolonas (43, 70) desarrolla efecto sinérgico (120, 136). Se entiende como tal a un efecto bactericida mucho más rápido o una disminución de por lo menos cuatro veces la concentración bactericida cuando se usa una combinación de ambas drogas en vez de cada agente por separado. Estas combinaciones resultan particularmente eficientes en el caso de pacientes neutropénicos (136). Para uso empírico estas duplas de ABs resultan de elección, particularmente si el AG empleado es capaz de actuar contra *P. aeruginosa* (10, 29, 136). Se estudia actualmente el efecto de la expresión de genes que confieren resistencia a tetraciclina (Tc), que aumenta en cepas de laboratorio la muerte por acción de Gm (119); esto podría desencadenar en el uso de AGs para tratamiento de infecciones por cepas resistentes a Tc.

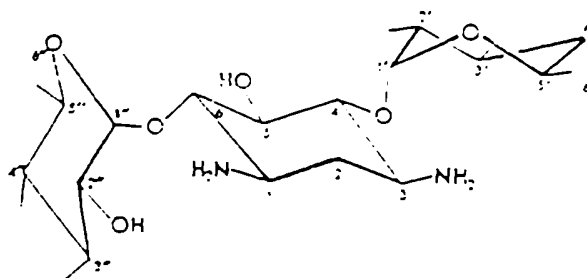
Los AGs no son absorbidos cuando se los suministra por vía digestiva. En cambio, desde depósitos subcutáneos o musculares pasan rápidamente a la sangre y de allí a todos los líquidos del organismo. Esto hace que se administren principalmente por inyección subcutánea o intramuscular, por vía intratecal en caso de meningitis (71, 163), o endotraquealmente en casos de neumonía (38). Algunos AGs como Km, suelen emplearse en tratamientos de infecciones intestinales, administrándose por vía bucal. Otros, como Nm, son de uso exclusivamente local sobre piel y mucosas debido a su elevada toxicidad. Estos ABs no son biotransformados y se recuperan en forma activa en orina y heces (109, 136).

El uso de AGs trae aparejados problemas de ototoxicidad provocados por unión del antibiótico a membranas (179); y nefrotoxicidad, debido a necrosis de los túbulos proximales del riñón, donde se acumulan selectivamente (25, 190). Estos inconvenientes se producen con distinta frecuencia según la droga y la dosis empleadas, y hacen necesario controlar el funcionamiento renal y auditivo de pacientes sometidos a tratamientos prolongados (25, 136). También es importante controlar la concentración de AG en sangre en pacientes con problemas de insuficiencia renal, ya que una disminución en la excreción de la droga trae aparejado un aumento de su concentración en el organismo y como consecuencia mayor riesgo de afecciones por toxicidad (12, 136, 187). Actualmente se estudian los efectos protectores que suelen ejercer sobre el riñón algunos ABs β -lactámicos al suministrarlos en combinación con AGs (76, 82). También se estudian los cambios en la farmacocinética de estos ABs para diferentes estados del organismo (12, 14, 63, 160, 162, 192) y distintas formas de aplicación (139, 161). Estos estudios tienden a encontrar la dosificación y la combinación de ABs más adecuada a emplear en cada caso, para evitar problemas de toxicidad renal u ótica.

1-1.1.1. Estructura.

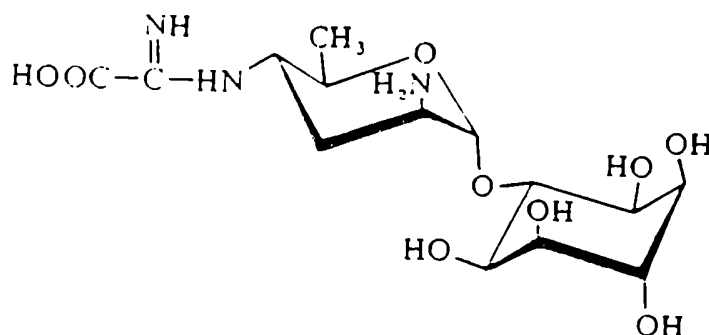
Los AGs con glucósidos, cuya ap glucosa es un derivado aminado de un polihidroxiciclohexano (estreptamina o deoxiestreptamina) y cuyos glúcidos son azúcares o deoxiazúcares, algunos aminados. El gran número de grupos aminados les confiere alta polaridad, y los grupos oxhidrilo solubilidad en agua (109). En su mayoría son estables en un amplio rango de pH y temperatura (104). Forman sales con ácidos minerales, de las cuales se emplean comúnmente los sulfatos en la forma comercial (104, 109, 136).

En la estructura de los AGs los sustituyentes en el anillo de estreptamina o 2-deoxiestreptamina se numeran 1-6, los del aminoazúcar unido a la posición 4 por una unión glicosídica 1'-6', los sustituyentes en la posición 5 o 6 del anillo de estreptamina o de 2-deoxiestreptamina 1''-6'' y así sucesivamente.



Aminoglicósido

Si se sustituye la deoxiestreptamina de Nm por estreptamina no cambia su potencia como antibiótico. Compuestos como fotimicina y sorbistina, que no contienen ninguno de estos dos grupos reconocen un sitio de unión a ribosomas, orientando sus grupos amino en la misma forma que estreptamina o deoxiestreptamina, lo cual les provee la estructura necesaria. De estas dos observaciones se deduce que la estreptamina o deoxiestreptamina son importantes, pero no el único grupo necesario para la actividad de los AGs (104). Sin embargo ABs aminociclitolos como kasugamicina que no contienen estreptamina o deoxiestreptamina, sino estreptidina, actúan por un mecanismo ligeramente diferente al de los AGs propiamente dichos (ver sección I-1.1.3).



Kasugamicina

La clave de la función con respecto a la estructura parece estar en que se trate de un disacárido que contenga estreptamina o deoxiestreptamina. Los sustituyentes del anillo de estreptamina o deoxiestreptamina modificarían el espectro de acción. El número de grupos amino afecta la potencia antibiótica, siendo más importantes los que se encuentran en las posiciones 6' y 2'. El grupo amino en la posición 3' de estreptamina es fundamental, ya que si se remueve o modifica el AG pierde su actividad. En el caso de Gm el grupo 2"-hidroxilo es también indispensable para la interacción con los ribosomas, si se remueve o epimeriza, ésta disminuye notablemente (104).

I-1.1.2. Ingreso a la célula.

A fin de ejercer su acción los AGs deben ingresar a la célula bacteriana, atravesando varias barreras. Algunas cepas bacterianas poseen cápsulas o capas de exopolisacáridos o ambas en su exterior. De acuerdo a modelos matemáticos (26) concordantes con experimentos de difusión de tobramicina (Tm) a través de alginato (polisacárido polianiónico de estructura similar a los que rodean *P. aeruginosa*) (128), las capas de polisacáridos no limitarían el acceso de AGs, salvo por una disminución de su difusión que sería mínima en comparación con el bloqueo ejercido por las membranas externa e interna.

En el caso de bacterias G(-) los ABs deben atravesar la membrana externa que éstas poseen. Esta membrana está formada por una bicapa de fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS) unidos fuertemente a cationes divalentes (Mg^{++} y Ca^{++}), y proteínas; distribuidos como se esquematiza en la Fig.1 (129). Existen tres vías conocidas de ingreso de sustancias a través de la membrana externa:

- a- pasaje por canales hidrofóbicos inespecíficos formados por proteínas denominadas porinas
- b- pasaje mediado por proteínas de transporte específicas
- c- pasaje hidrofóbico, que incluye solubilidad en la bicapa lipídica

En el caso de *P. aeruginosa* se ha encontrado que la mayoría de sus canales inespecíficos no son funcionales, resultando su membrana externa poco permeable a ABs hidrofílicos como los AGs (170). En cambio estos últimos, al igual que otros policationes como polimixina y poliaminas (79), cruzarían esta membrana por medio de un sistema de pasaje auto-promovido, relacionado con disrupción de los puentes (LPS)- Mg^{2+} . Los policationes se unirían a los LPS desplazando a los cationes divalentes y produciendo un reordenamiento de la estructura de membrana. Se formarían así canales hidrofílicos artificiales por donde ingresarían los AGs (80). Existen evidencias morfológicas de cambios estructurales producidos por AGs en la membrana externa que apoyan este modelo (111). Parece probable que ocurra lo mismo en enterobacterias, aunque para ellas no se descarta la posibilidad de ingreso de AGs a través de los canales hidrofílicos inespecíficos, ya que el límite de exclusión de sus poros funcionales es muy similar al tamaño de estos ABs.

En el caso de bacterias G(+) no existe el impedimento de la membrana externa. La estructura del péptidoglicano excluye moléculas de tamaño mucho mayor que los AGs. Sin embargo muchas especies de bacterias G(+) contienen ácido teicoico (unido covalentemente a péptidoglicano) y lipoteicoico (embebido no covalentemente en la membrana citoplasmática y a menudo extendiéndose todo a lo largo de la pared). Estos ácidos son capaces de unir AGs (99); y podrían constituir los sitios de unión inicial a células intactas. Algunos AGs pueden desplazar Mg^{++} de ácidos teicoicos in vitro (99). Este catión se encuentra normalmente asociado al

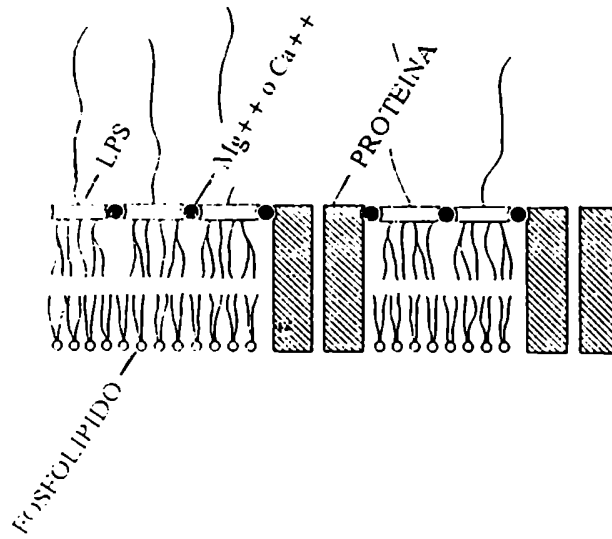


Figura 1. Estructura de membrana externa. Esquema de la estructura de la membrana externa de bacterias G(-).

exterior de bacterias G(+), contribuyendo a la estabilidad de sus envolturas. Por lo tanto es posible que estos ABs actúen sobre ácido teicoico y lipoteicoico en forma similar a lo que ocurre con los LPS de membranas externas de bacterias G(-). Una posible explicación del sinergismo entre algunos ABs β -lactámicos y AGs es que los primeros produzcan pérdida de ácido teicoico y péptidoglicano de la pared celular, reduciendo la importancia de este obstáculo para el ingreso del AG.

La acumulación de AGs en el interior de células bacterianas ocurre en tres etapas (170):

I- Unión iónica.

II- Etapa dependiente de energía I (EDPI)

III- Etapa dependiente de energía II (EDPII)

I- Esta etapa consiste en la unión electrostática de los AGs a los sitios aniónicos de las bacterias. Se produce en forma instantánea y reversible al agregar el AB a una suspensión de bacterias, no requiere energía, y depende de la concentración de AG agregada. La presencia de otros poliones antagoniza la unión del AG. En esta etapa el AB puede llegar al periplasma y por último a la membrana citoplasmática de la célula.

II- EDPI es anterior a la inhibición de la síntesis proteica y la pérdida de viabilidad producidas por el AG. Esta etapa puede ser bloqueada por inhibidores de transporte electrónico (p.e. cianuro, anaerobiosis) y de fosforilación oxidativa (p.e. dinitrofenol). Algunos autores (28, 44) sugieren que EDPI representa pasaje del AB a través de la membrana citoplasmática debido al potencial de membrana. También podría representar pasaje lento a través de canales inespecíficos, creados en la membrana citoplasmática por leves errores intrínsecos de lectura en la traducción (45). Otros (170) consideran que es una etapa de unión progresiva de la droga a la parte externa de la membrana citoplasmática, sin ingreso de la misma a la célula.

III- EDPII representa una aceleración lineal del transporte de AG a través de la membrana citoplasmática, en un proceso que utiliza energía de transporte electrónico y posiblemente de ATP. Este proceso exhibe cinética de difusión (45), no representa a un sistema de transporte saturable.

Se han efectuado estudios de competición para transporte entre AGs y sustancias cuyos sistemas específicos de transporte se conocen, a partir de ellos se concluyó que estos ABs no utilizan esos sistemas para su transporte "ilícito" a través de la membrana (170). No se puede descartar la alternativa de que múltiples sistemas de transporte de baja afinidad contribuyan cada uno en pequeña proporción al ingreso total de AG. Existen evidencias que EDPII no se debe tampoco a un aumento del potencial de membrana como consecuencia de los primeros efectos del AG (170).

Esta etapa es irreversible y requiere síntesis de proteínas. Puede ser reducida o eliminada por acción de cloranfenicol (Cm) (inhibidor de peptidil transfer); en cambio puromicina (libera prematuramente cadenas polipeptídicas) induce captación de AG cuando se encuentra en concentración baja, y la disminuye cuando está en concentración alta.

Bryan elaboró un modelo (27) para explicar EDPII. Según él habría un "evento de transferencia" progresiva de AG a los ribosomas unidos a la membrana citoplasmática que resultaría en la degradación de polisomas, acumulación de los ribosomas liberados, e inhibición de la síntesis proteica. EDPII resultaría de la aceleración de los eventos de transferencia y compromiso de la integridad y función de la membrana citoplasmática que llevaría a la muerte celular. Este modelo no

explica cómo los AGs, que se encuentran en el exterior de la célula, interactúan con ribosomas en la parte interna de la membrana citoplasmática en forma acelerada y no saturable. Tampoco concuerda con que el número de moléculas de AB que ingresan a la célula es superior al número de ribosomas que ella contiene, sugiriendo que los polisomas no son un sumidero de AGs. Otro modelo, propuesto simultáneamente por Davis (45) y por Busse y Bakker (170), sugiere que EDPII resulta de la incorporación a la membrana citoplasmática de proteínas que llevan errores de traducción introducidos por acción del AB. Estas proteínas actuarían como canales inespecíficos facilitando la traslocación de AGs, que ingresarían a la célula favorecidos por el potencial de membrana. Sería un proceso autocatalítico en el cual a mayor ingreso de AG se produciría mayor cantidad de errores en la traducción y mayor formación de canales. Este modelo no explica el ingreso de AB durante EDPII (en ausencia de proteínas defectuosas), aunque propone que éste podría deberse a canales creados por un nivel bajo de errores de traducción intrínseco, a imperfecciones inevitables en el proceso de crecimiento celular que ocasionalmente produjeran canales entre los constituyentes normales, o a transporte ilícito a través de un sistema específico para algún otro compuesto. El modelo tampoco da cuenta de la necesidad de que exista transporte electrónico; ni de la irreversibilidad del ingreso de AG. Sí permite entender el efecto de Cm y puromicina. Esta última a bajas concentraciones liberaría prematuramente cadenas polipeptídicas, que formarían canales de membrana; sin embargo a altas concentraciones las cadenas liberadas serían demasiado cortas para poder ingresar a la membrana e inducir EDPII, la entrada de AG se reduciría por efectos sobre la fisiología o metabolismo celular. Si asumimos que la inserción de proteínas a la membrana citoplasmática requiere energía, posiblemente en forma de ATP (42); la necesidad de transporte electrónico podría explicarse como la forma de generación del ATP requerido para este proceso.

Cabe destacar que los experimentos destinados a comprender el ingreso de AG a la célula han sido efectuados con Sm o Gm; por lo tanto la generalización a todos los AGs podría constituir un error.

1-1.1.3. Mecanismo de acción.

El mecanismo de acción de los AGs ha sido fruto de estudios mas extensivos y en mayor número de laboratorios que el de ningún otro grupo de ABs. Esto se debió a los efectos pleiotrópicos que producen, dificultando la elaboración de un modelo apropiado para explicarlos a todos.

Sus efectos mas importantes son:

- * bloqueo de ribosomas
- * errores de traducción
- * daño de la membrana citoplasmática

Se han descripto además alteraciones en la síntesis de ADN, ARN y poliaminas, y en los niveles de AMPc y guanosina tetrafosfato, que parecen ser secundarios a otras perturbaciones metabólicas: inhibición de síntesis proteica (con la consecuente acumulación de r -ARN), acumulación de proteínas que llevan errores de traducción, alteración en la composición y permeabilidad de la membrana y sus consecuencias en la composición iónica.

Los ABs aminociclitolos, que no contienen un grupo estreptamina o deoxiestreptamina (como spectinomycin y kasugamicina), difieren de los AGs propiamente dichos en que no producen errores en la traducción y no tienen efecto bactericida sino bacteriostático; por lo tanto se supone que no actúan por el mismo mecanismo.

Los primeros estudios con AGs (Sm) mostraron que no producen lisis celular sino que detienen la síntesis proteica rápida e irreversiblemente, dejando a la célula prácticamente intacta. Esta acción es inhibida por Cm (93), indicando que requiere síntesis de proteínas. El segundo efecto descubierto fue el daño de la membrana citoplasmática. Se observó que el ingreso de AG a las células bacterianas consta de tres etapas, de las cuales la última sólo pudo explicarse cuando se demostró que el AB altera la membrana (ver sección I-1.1.2). Las bacterias tratadas con AG presentan permeabilidad aumentada a moléculas pequeñas, ya sean cationes, aniones o moléculas no cargadas, pero no liberan macromoléculas. La presencia simultánea de Cm no solo previene la muerte celular sino que también evita la tercera etapa de ingreso del AG (EDPII), y la permeabilidad a moléculas pequeñas; por lo tanto se concluyó que el AG no afecta a la membrana preexistente, sino a algún componente de la membrana en crecimiento (7).

El sitio de acción de los AGs, los ribosomas, fue identificado muy tempranamente. Su unión a ellos afecta la síntesis proteica ya sea inhibiendo o estimulando la unión de aminoacil-ARN, y produciendo efectos en la iniciación, elongación o terminación (8). Estos efectos difieren para distintos AGs, presumiblemente por su diferente sitio de unión a alguna o ambas subunidades ribosomales (47). Durante muchos años se creyó que el AB interactuaba específicamente con alguna proteína de los ribosomas. Sin embargo se comprobó posteriormente que Sm se une a un sitio específico en el 16S rARN, que el AG se incorpora a las partículas e interfiere con su ensamblaje, y que en ciertos microorganismos productores de AG la resistencia a los mismos está dada por modificación enzimática de su rARN en un sitio específico (15). Además algunas cepas se tornan resistentes a AGs por cambio de una única base en su rARN. Todo esto indica que el rARN es el sitio blanco, o al menos el corazón del sitio de unión de los AGs al ribosoma.

Cuando se descubrió que Sm producía errores en la traducción surgió un interrogante acerca de por qué según la concentración el AB bloquea a los ribosomas o produce errores en la traducción. Actualmente se cree que a bajas concentraciones de AG en el interior de la célula éste encuentra predominantemente polisomas, a los cuales se une disminuyendo el grado y fidelidad en la elongación. A concentraciones altas la droga alcanza a todos los ribosomas, incluyendo los involucrados en iniciación, y detiene la síntesis de proteínas. Con respecto a la iniciación los AGs permiten la formación del complejo de iniciación pero evitan su continuación en elongación de la cadena y producen, luego de varios minutos, su disociación. El mecanismo molecular de este efecto no se conoce en detalle. En cuanto a la terminación, Sm parece bloquearla, interfiriendo en la interacción ribosomas-factor de liberación (8).

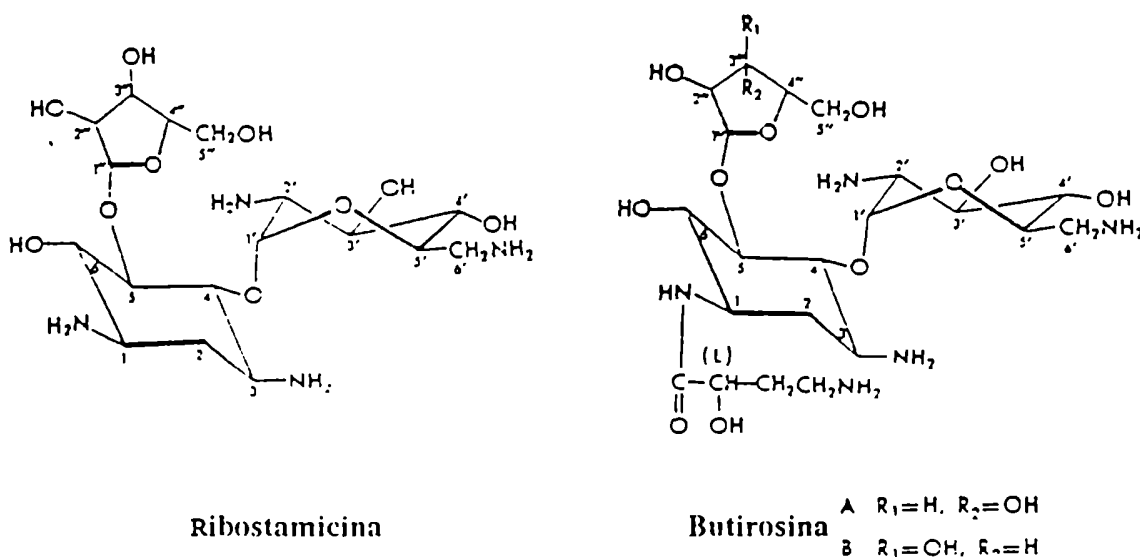
En base a todo lo anterior, y luego de comprobar que proteínas con errores de traducción pueden crear canales en la membrana citoplasmática (46) Davis propuso un modelo en varios pasos, cuya secuencia es:

- a- Ingreso a la célula, por un mecanismo desconocido, de una pequeña cantidad de AB que contacta los ribosomas involucrados en elongación de cadenas polipeptídicas produciendo errores de traducción.
- b- Algunas de las proteínas con errores de traducción se incorporan a la membrana creando canales que permiten influjo de AG, en un proceso autocatalítico (sección I-1.1.2.).
- c- La concentración de AG intracelular alcanza un valor tal que éste bloquea todos los ribosomas involucrados en iniciación, evitando posterior síntesis de proteínas.
- d- Muerte celular como resultado de la irreversibilidad del bloqueo ribosomal, del ingreso de AG y posiblemente de la unión a ribosomas involucrados en iniciación.

I-1.1.4. Amikacina.

Existen numerosas cepas bacterianas resistentes a AGs, la mayoría debido a la acción de enzimas que los inactivan (sección I-1.2.3.). Cuando se conocieron estas enzimas surgió la inquietud de modificar químicamente AGs, ya sea en el grupo funcional que ellas atacan, o en algún otro grupo importante para la interacción con las enzimas modificadoras. Utilizando este último concepto se desarrolló Ak, derivado semisintético de Km.

Km es un valioso quimioterápico de baja toxicidad; pero su espectro es algo limitado, ya que es inactiva contra especies de *Pseudomonas* y contra muchos aislamientos clínicos resistentes a otros AGs. Este AB fue elegido por Kawaguchi (94) como punto de partida para la elaboración de un AG semisintético. Con respecto a la modificación a introducir, comparando butirosina con ribostamicina notó que la única diferencia estructural entre ambas es la sustitución de H (en ribostamicina) por ácido L(-)-amino- α -hidroxibutírico (L-AHBA) (en butirosina); sin embargo el espectro de acción de la primera es mucho mayor que el de ribostamicina.



Decidió entonces introducir el grupo L-AHBA en Km, y por acilación del grupo amino en su C-1 con este aminoácido obtuvo Ak (Fig.2). Este AB tiene un espectro de acción y una actividad intrínseca mucho mayor que los de Km (94) (Tabla I), ya que inhibe el crecimiento de varios organismos resistentes a AGs. Los isómeros posicionales de Ak que se obtienen por acilación de cualquiera de los otros tres grupos amino de Km son muy poco activos como AB, al igual que sus isómeros configuracionales, obtenidos por acilación de Km con DL-AHBA o D(+)-AHBA.

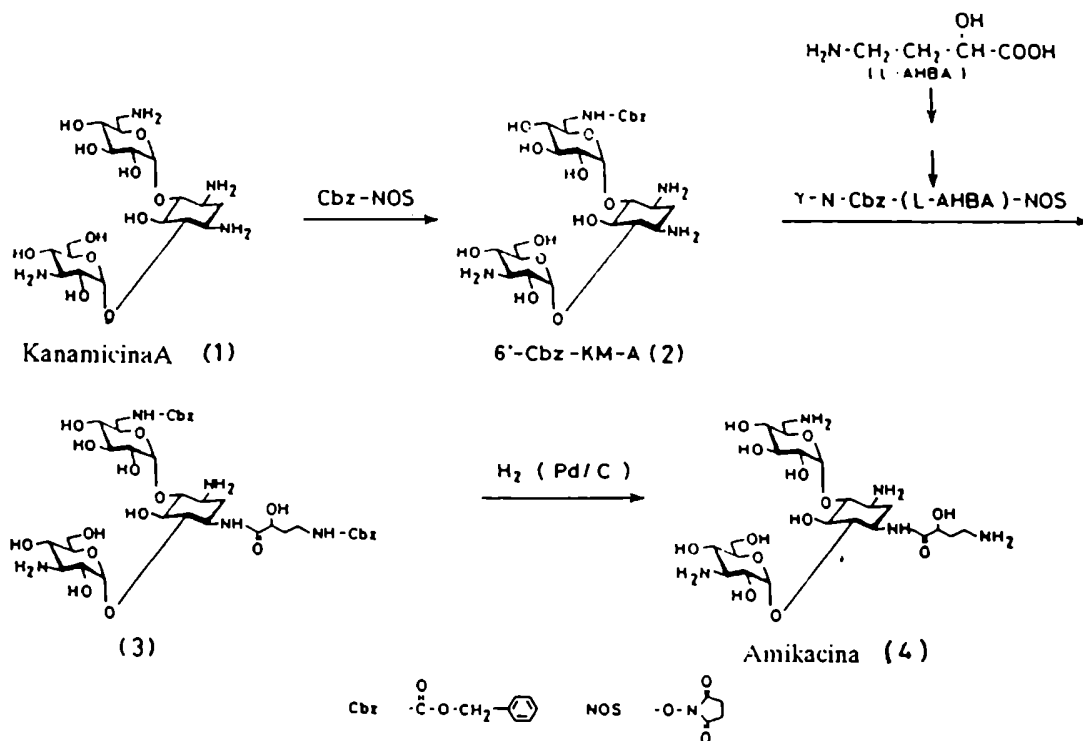


Figura 2. Amikacina. Se muestra la reacción secuencial utilizada para la preparación de Ak. En el primer paso se protege el grupo 6'-amino de KmA (1) (que es el más reactivo de sus cuatro grupos amino) con un grupo carbobenzoxi (Cbz), obteniéndose 6'-Cbz-KmA (2). El agente de acilación se prepara protegiendo el grupo γ -amino del ácido L-AHBA con un grupo carbobenzoxi, y posterior reacción con N-hidroxisuccinimida (NOS) para formar el éster activo. La acilación ocurre predominantemente en el segundo grupo amino más reactivo de KmA (carbono 1), dando el compuesto (3). Por medio de hidrogenólisis se remueven los grupos protectores produciéndose Ak (4).

Tabla I. Actividad de Ak y Km contra diferentes cepas bacterianas.

microorganismo	MIC(mcg/ml)		relación entre radios
	Ak	Km	
<i>E. coli</i> ML-1630	1,6	100	64
<i>E. coli</i> C600	0,2	100	128
<i>K. pneumoniae</i> D-11	0,4	1,6	4
<i>Klebsiella</i> sp. A9661	0,8	3,2	4
<i>Proteus morgani</i> A20031	1,6	3,1	2
<i>Proteus vulgaris</i> A9699	0,4	0,8	2
<i>P. aeruginosa</i> D.15	6,3	50	8
<i>P. aeruginosa</i> A9843A	6,3	100	16
<i>S. aureus</i> Terajima	0,2	0,4	2
<i>S. aureus</i> A20240	6,3	100	16
<i>M. tuberculosis</i> Ogawa	10,5	50	4,8
<i>M. tuberculosis</i> Nakamura	0,4	1,1	2,7

Los AGs actualmente en uso son Ak, Gm, Nm y Tm, todos ellos son similares en cuanto a seguridad y eficacia (contra patógenos sensibles). Por lo tanto la selección del agente a utilizar en forma empírica (sección I-1.1.) depende fundamentalmente del sinergismo y la resistencia bacteriana (195). Ak muestra mayor sinergismo con ABs β -lactámicos (195) y lipopéptidos (52) que los demás AGs, y se han aislado menor cantidad de cepas resistentes a ella que a los otros AGs, incluidos aislamientos de *P. aeruginosa*. Esto último se debe a que es refractaria a la mayoría de las enzimas modificadoras que utilizan las bacterias para inactivar AGs. En cuanto a su farmacocinética, Ak alcanza niveles en sangre 4 o 5 veces superiores a los de Gm o Tm para la misma forma de aplicación. Estos niveles son muy inferiores a las concentraciones tóxicas para el organismo huésped y son suficientes para producir la muerte (y no solamente inhibición del crecimiento) de los patógenos usuales (121). Su cinética permite además una única aplicación diaria, mientras que Gm y Tm requieren por lo menos tres (39). Por todo esto Ak es el AG de elección para uso empírico en pacientes comprometidos (90), y su uso debiera limitarse a estos casos y a infecciones por cepas resistentes a los demás AGs.

I-1.2. Resistencia a aminoglicósidos.

A partir del uso de AGs en tratamientos clínicos han podido aislarse numerosas cepas bacterianas resistentes a ellos. Esto ha llevado a diversos grupos a efectuar estudios en hospitales con el fin de determinar la influencia de la utilización de estos ABs sobre la aparición de cepas resistentes. De esta forma se ha encontrado que el uso de AGs en general aumenta la aparición de cepas resistentes a ellos. En cambio el uso de Ak como AG de primera línea lleva a una disminución del número de cepas bacterianas resistentes a otros AGs, con un aumento de cepas resistentes a Ak igual al que se produce cuando no se usa esta droga (69, 121, 154, 155). El uso indiscriminado de Ak, particularmente en países en desarrollo, a llevado a la aparición de numerosas cepas resistentes a ella (102, 181, 193). Algunos autores consideran que reciclando los ABs en forma apropiada podría prolongarse

considerablemente su vida útil (49). Otros creen que ya hemos alcanzado un punto sin retorno (47), debido principalmente a que las resistencias a varios ABs se presentan muchas veces codificadas en "paquetes", de forma que el uso de uno selecciona resistencia a otros, además de a sí mismo (112).

La resistencia a AGs puede presentarse a tres niveles diferentes: alteración de su afinidad por los ribosomas; alteraciones que impiden su ingreso a la célula; modificación enzimática del AG rindiéndolo inactivo. Estos mecanismos pueden aparecer en forma única o combinados en las células resistentes (143, 155).

Cualquiera sea el mecanismo, la resistencia a AGs difiere de lo que ocurre para otros ABs (como Cm o β -lactámicos) en que prácticamente toda la droga permanece activa en el medio de cultivo; mientras que en el interior de la célula la cantidad del AG es muy baja o inexistente (49). Es por lo tanto un caso de resistencia extremadamente eficiente y económico, aunque poco caritativo para con los otros miembros de la población bacteriana (47).

I-1.2.1. Alteración de la afinidad por el ribosoma.

Se han reportado numerosos casos de aislamientos clínicos que presentan resistencia debido a modificaciones ribosomales, principalmente para Sm (59). Se cree que estas modificaciones se deben a mutaciones en el rARN (26), para el cual la sustitución de una sola base puede ser suficiente para conferir resistencia (117). Este mecanismo se ha encontrado también en organismos productores de AGs. En el caso de *Micromonospora purpurea*, productor de Gm, por metilación de cualquiera de dos residuos de su rARN se produce resistencia a Gm, y también a Km (15). La metilación postranscripcional del rARN es empleada por organismos productores de otros inhibidores de síntesis proteica como mecanismo de autodefensa, y se ha encontrado también en aislamientos clínicos, principalmente de cepas G(+). Este mecanismo se debe, en todos los casos descritos, a la expresión de genes que se encuentran en el cromosoma bacteriano.

I-1.2.2. Inhibición del ingreso a la célula.

Todas las bacterias anaeróbicas estrictas, que no respiran utilizando una cadena de transporte electrónico que contenga quinonas, carecen de la capacidad de acumular AGs en su interior, y son naturalmente resistentes a ellos. También presentan resistencia, aunque de bajo grado, bacterias fermentativas que poseen cadenas de transporte electrónico incompletas, como algunos miembros del género *Streptococcus*. Dado que no se conoce de que manera actúa la cadena de transporte electrónico en el ingreso de AGs a la célula (sección I-1.1.2) no se puede inferir el mecanismo de este tipo de resistencia, aunque se ha propuesto que lo que ocurre es que no se alcanza el potencial de membrana necesario para el transporte de los mismos (26).

También se ha encontrado resistencia por falta de ingreso a la célula bacteriana en aislamientos clínicos (155), principalmente de *P. aeruginosa*, pero también de *K. pneumoniae*. La importancia de estos aislamientos radica en que son cepas resistentes a prácticamente todos los AGs de uso terapéutico. Esta resistencia no es transferible, se debe a mutaciones en el cromosoma bacteriano, y es muy estable, manteniéndose en ausencia de exposición a AGs. En estos casos la cadena de transporte electrónico y el potencial de membrana son normales, y la síntesis proteica es sensible a AGs. Se cree que la resistencia se debe a modificaciones en los

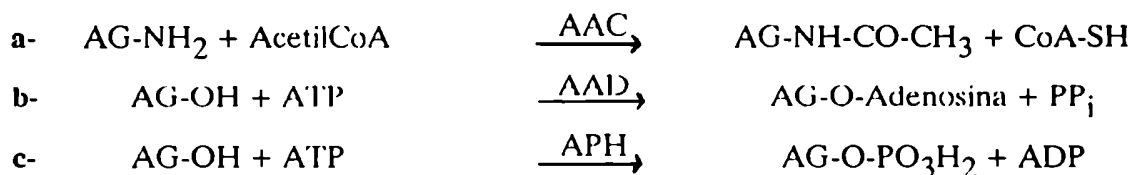
LPS, que rinden la superficie de la célula mas hidrofóbica, reduciendo el acceso del AB.

Existe también resistencia a AGs debido a mutaciones que afectan la cadena de transporte electrónico o el potencial de membrana, impidiendo el ingreso del AB a la célula. Esto produce resistencia de bajo nivel, pero de amplio espectro, y tiene gran tendencia a revertir, características que, junto con su baja velocidad de crecimiento, hacen que sean cepas difíciles de aislar en laboratorios clínicos. A diferencia de los mecanismos anteriormente descritos, en este caso la resistencia surge durante la terapia, en vez de existir previamente.

Una forma de resistencia, llamada fenotípica, asociada a los dos mecanismos mencionados es producida por las condiciones ambientales, que reducen la captación de AGs y su transferencia a ribosomas. Se presenta al cultivar bacterias facultativas en condiciones anaeróbicas, o a pH o fuerza iónica bajos (posiblemente por disminución del potencial de membrana) (32, 59). También por presencia de cationes divalentes (Mg^{++} o Ca^{++}), poliaminas u otros policationes, que compiten con los AGs por la interacción con residuos fosfato de LPS, ácidos teicoicos y lipoteicoicos, y fosfolípidos; produciendo menor captación de AGs.

I-1.2.3. Modificación enzimática.

El mecanismo mas frecuente de resistencia a AGs es la modificación enzimática de los mismos. Las enzimas modificadoras de amoniglicósidos (EMAs) catalizan tres tipos de reacciones diferentes: N-acetilación (reacción a), O-adeninilación (reacción b) y O-fosforilación (reacción c).



Cada tipo de reacción puede ser catalizada por enzimas que atacan distintos grupos amino o hidroxilo del AB, y existe mas de una enzima capaz de modificar cada grupo específico mediante un mismo tipo de reacción, estas últimas difieren generalmente en el espectro de sustratos que modifican (159).

Las EMAs se denominan de acuerdo al tipo de reacción que catalizan AG acetiltransferasa (AAC), AG fosforiltransferasa (APH) y AG nucleotidiltransferasa o AG adeniniltransferasa (ANT o AAD). En su nomenclatura se indica el sitio del AG que atacan mediante un número entre paréntesis (ver sección I-1.1.1. para la numeración en la molécula de AG). Se agrega además un número indicativo de un grupo de EMAs que presentan un determinado perfil de sustratos. Así por ejemplo AAC(6')₄ es una EMA que acetila el grupo amino de la posición 6' de Gm, Tm, Km y Ak (159). Para ubicar una EMA en un grupo se debe determinar el tipo de reacción que cataliza, mediante el uso de sustrato AcetilCoA o ATP radioactivo; y el sitio que modifica por análisis de la estructura química del AG modificado. En la práctica, por comparación del perfil de sustratos que modifica con los de enzimas conocidas, se puede deducir a que grupo corresponde (12).

Cada EMA presenta distintas K_M para los diferentes AGs; esta constante mide la afinidad de la enzima por cada AG en particular. La resistencia resulta de la competencia entre el ingreso de AG y su modificación, por lo cual una EMA no confiere necesariamente resistencia a todos los AGs que es capaz de modificar

efectivamente *in vitro* (26). El grado de resistencia está relacionado también con la cantidad de EMA presente, principalmente en el caso de sustratos que son modificados en forma relativamente ineficiente (26).

Estas enzimas pueden caracterizarse en forma sencilla y algunas han sido purificadas (191), sin embargo la purificación es difícil, debido a que se encuentran en cantidades pequeñas y son relativamente inestables (104). La purificación parcial y caracterización de varias EMAs permitió conocer propiedades generales: el peso molecular oscila entre 20.000 y 63.000; el pH óptimo presenta bastante variabilidad, pero generalmente está entre 7,5 y 8; algunas son multiméricas. Tradicionalmente se ha considerado su expresión como constitutiva (26, 49) o parcialmente constitutiva, ya que se sintetizan en ausencia de AGs; sin embargo existen evidencias de control de la expresión génica por catabolito (23).

Se cree que las EMAs se encuentran localizadas en el espacio periplásmico de las bacterias G(-), pudiendo ser liberadas por shock osmótico. Sin embargo son retenidas parcialmente en esferoplastos (26), lo cual hace suponer que podrían estar asociadas a la membrana interna, por interacciones débiles. Estas enzimas actúan sobre las moléculas de AG que acceden al espacio periplásmico, de forma que ingresa al citoplasma AG modificado, generalmente inactivo. El AG modificado, inactivo, no interacciona con los ribosomas, de forma que no se desencadena la etapa EDPH de ingreso a la célula (sección I-1.1.2.).

La gran mayoría de los genes que codifican EMAs se han encontrado localizados en plásmidos, y muchas veces en transposones; sin embargo se han presentado casos de localización cromosomal (26). Se han secuenciado varios genes codificadores de EMAs (86, 103, 130, 164, 173, 180). La comparación de secuencias codificadoras de EMAs provenientes de aislamientos clínicos y de microorganismos productores de AGs ha mostrado en algunos casos homología consistente con un origen evolutivo común (86). Además de estudios evolutivos (60), la comparación de secuencias permite diferenciar EMAs que producen la misma reacción sobre diferente espectro de sustratos, el uso de sondas específicas (13, 172) para los genes que codifican EMAs permite también efectuar estudios epidemiológicos (133, 196).

Siendo las EMAs la forma principal de resistencia a AGs se ha intentado neutralizar su acción mediante la alteración química de AGs a formas que presenten altas K_M para las enzimas conocidas. Desafortunadamente se ha encontrado que las características estructurales necesarias para la actividad enzimática generalmente coinciden con las requeridas para actividad antibiótica (67). A este respecto puede considerarse como excepción Ak, AG semisintético de alta actividad, amplio espectro de acción, y que en principio se consideró no modificable por EMAs. Posteriormente se identificaron algunas EMAs capaces de modificar Ak (22, 91, 92, 102, 122, 127, 142, 193). Otra forma de encarar el problema es el uso de inhibidores de EMAs (26, 49), pero esta alternativa aún no ha sido explotada. El problema se agrava ya que no solamente no se han encontrado formas efectivas de contrarrestar la acción de EMAs, sino que continuamente se detectan nuevos tipos de estas enzimas, no solamente en aislamientos clínicos, sino también en cepas provenientes del medio ambiente (144, 186).

I-1.3. Resistencia a AGs mediada por plásmidos.

Los plásmidos son un grupo diverso de elementos genéticos extracromosomales que se han encontrado en casi todos los géneros bacterianos, y también en células eucariotas. Son moléculas de ADN circular covalentemente cerradas que no resultan esenciales para la vida microbiana, sino que adicionan su

información a la del genoma, proveyendo funciones dispensables que muchas veces otorgan ventajas sobre organismos libres de plásmidos bajo ciertas condiciones. Todos ellos codifican funciones que les permiten particionarse a las células hijas en el momento de la división celular.

Estos elementos pueden ser conjugativos, es decir, capaces de autotransmitirse de una célula bacteriana a otra; o no conjugativos. Algunos plásmidos no conjugativos pueden utilizar las funciones de conjugación de otros para transferirse por conjugación. Los plásmidos también pueden ser transmitidos por medio de un bacteriófago vector (transducción) o pueden ser tomados por células bacterianas del medio ambiente que las rodea (transformación). Estos tres mecanismos aseguran su transmisión inter e intragenérica, permitiendo su veloz diseminación. La transferencia por conjugación es un proceso en el cual una hebra de ADN queda en la célula dadora y la otra ingresa a la aceptora, en ambas células se sintetiza la hebra complementaria, aumentando el número de bacterias que contienen el plásmido (57).

Cada plásmido se caracteriza por presentarse en las células que lo contienen un número fijo de veces que se denomina número de copias. Los diferentes plásmidos se clasifican en grupos de incompatibilidad que comprenden cada uno a todos los elementos que por tener sistemas de replicación o partición muy similares no pueden coexistir en forma estable en la misma célula (36).

Entre las múltiples funciones codificadas por plásmidos que se conocen se encuentra la resistencia a una variedad de agentes tóxicos para bacterias como bacteriófagos, bacteriocinas, metales pesados, radiación ionizante, componentes séricos, detergentes, y ABs (48). La mayoría de las resistencias a ABs clínicamente significativas son determinadas por genes localizados en plásmidos, lo cual permite su diseminación, principalmente por conjugación. Frecuentemente los genes responsables de resistencia a ABs se encuentran en unidades genéticas llamadas transposones, que tienen la capacidad de transponerse de una molécula de ADN a otra, contribuyendo a su rápida diseminación (62). La transposición de determinantes genéticos para resistencia a ABs entre plásmidos es muy frecuente, y dado que los transposones pueden incorporarse al cromosoma bacteriano los genes de resistencia aislados en plásmidos pueden provenir del cromosoma y viceversa.

Dada la capacidad de autotransmisión intra e intergenérica de muchos plásmidos, y que muchos genes de resistencia pueden expresarse en bacterias pertenecientes a distintos géneros, tanto G(+) como G(-), estos elementos proveen una forma excelente de diseminación de resistencia. Muchos plásmidos codificadores de resistencia son inestables y se pierden en ausencia de ABs, mientras que otros se heredan en forma estable. El uso intensivo de agentes antimicrobianos ha provisto una fuerte selección de aquellas bacterias que adquirieron genes de resistencia, ya sea por mutación o por incorporación de plásmidos de resistencia a partir de fuentes desconocidas (51).

En lo que se refiere a AGs la forma más común de resistencia a ellos es a través de EMAs codificadas prácticamente todas por genes ubicados en plásmidos (62). Estudios epidemiológicos han podido comprobar la diseminación de plásmidos codificadores de resistencia a AGs en cepas bacterianas aisladas de diferentes pacientes (134), e incluso pertenecientes a diferentes géneros (156). Se ha propuesto que las proteínas de funciones dispensables son particularmente proclives a aceptar sustituciones de aminoácidos, esto hace que la evolución de los genes codificados en plásmidos sea inusualmente rápida, y podría explicar el origen de EMAs que, siendo muy similares entre sí, actúan sobre diferente rango de sustratos (51). Podría explicar también la rápida aparición de EMAs capaces de inactivar AGs semisintéticos como Ak, que eran refractarios a las EMAs conocidas cuando se comenzaron a utilizar.

Se ha observado que cepas resistentes a AGs debido a EMAs codificadas por plásmidos pueden ser llevadas a resistir mayores dosis de droga si se va aumentando gradualmente la concentración de AB en la que se cultivan. Dado que la expresión de EMAs se considera constitutiva o al menos parcialmente constitutiva (se producen en ausencia de AG) se ha propuesto que el aumento de resistencia podría deberse a amplificación del gen codificador de EMA, o a aumento del número de copias del plásmido (51).

I-2. Elementos Transponibles.

Los transposones son segmentos de ADN específicos que pueden moverse de una localización genética a otra. Estos elementos fueron descubiertos originalmente por Bárbara Mc Clintock en la década de 1940 en plantas de maíz, en las cuales observaba que algunos genes se activaban e inhibían anormalmente. Ella postuló que este fenómeno se debía a la acción de unidades genéticas discretas capaces de moverse de un sitio a otro en diferentes cromosomas de las células de maíz, y las denominó "elementos controladores". Sin embargo debieron transcurrir veinte años antes que sus informes fueran tenidos en cuenta, al descubrirse la existencia de mutaciones en *E. coli* debidas a la inserción de fragmentos discretos de ADN en las moléculas de ADN originales. Esos segmentos insertados se denominaron secuencias de inserción (IS), y posteriormente transposones o elementos transponibles por su capacidad de transponerse de una molécula de ADN a otra. Se han encontrado transposones en bacterias, levaduras, plantas y células animales. En el caso de bacterias algunos transposones son constituyentes normales del genoma, y muchos se han aislado de localizaciones extracromosomales, en plásmidos y bacteriófagos.

Además del evento de transposición, que en procariontes se da con una frecuencia de 10^{-4} a 10^{-7} por generación, promueven una variedad de rearrreglos genéticos. Pueden alterar la organización y expresión de los genomas, siendo por lo tanto de gran importancia evolutiva. Su capacidad de insertarse en diferentes moléculas de ADN, y el hecho que muchos contengan determinantes genéticos para resistencia a ABs hacen que tengan gran importancia epidemiológica, como agentes diseminadores de resistencia (Fig. 3). Se ha encontrado que algunos transposones portadores de resistencia a ABs son conjugativos, pudiendo diseminar genes de resistencia independientemente de la presencia de plásmidos (34).

La recombinación transposicional es diferente de los mecanismos de recombinación homóloga e independiente de ellos, ya que transcurre a frecuencias normales en mutantes bacterianas *recA*, incapaces de promover recombinación homóloga. Puede originar una variedad de rearrreglos, todos involucrados con la unión de los extremos del transposón a nuevos sitios en eventos intra o intermoleculares. Los intermoleculares pueden resultar en inserciones simples, o en fusión de replicones, o cointegrados (Fig. 4-A), según se inserte el transposón solo o toda la molécula donora en el ADN blanco. Los intramoleculares son equivalentes a la formación de cointegrados, y dependiendo de la orientación del sitio blanco con respecto a los extremos del transposón resultan en delección o inserción-inversión (Fig. 4-B). En esencia, todos los rearrreglos pueden resultar de uno de dos procesos:

- "inserción simple" del transposón por unión de sus dos extremos a las secuencias blanco, sin que medie replicación del elemento
- cointegración, en la cual por replicación se forman dos copias del elemento transponible, conservando cada una un extremo unido a la molécula parental, mientras que el otro se une a secuencias del ADN blanco (75).

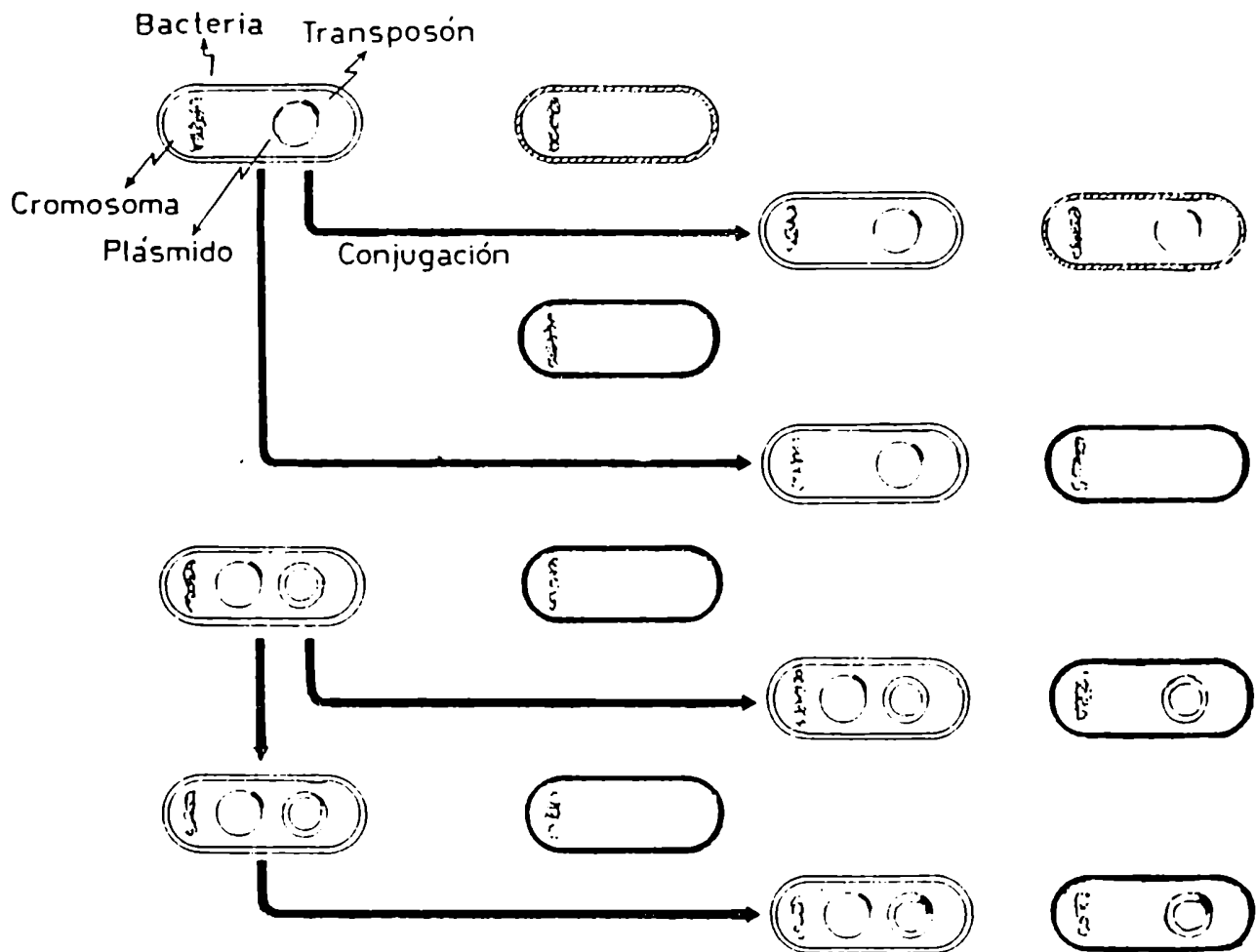


Figura 3. Diseminación de genes presentes en un transposón. La diferencia de pared indica distintas especies o géneros bacterianos.

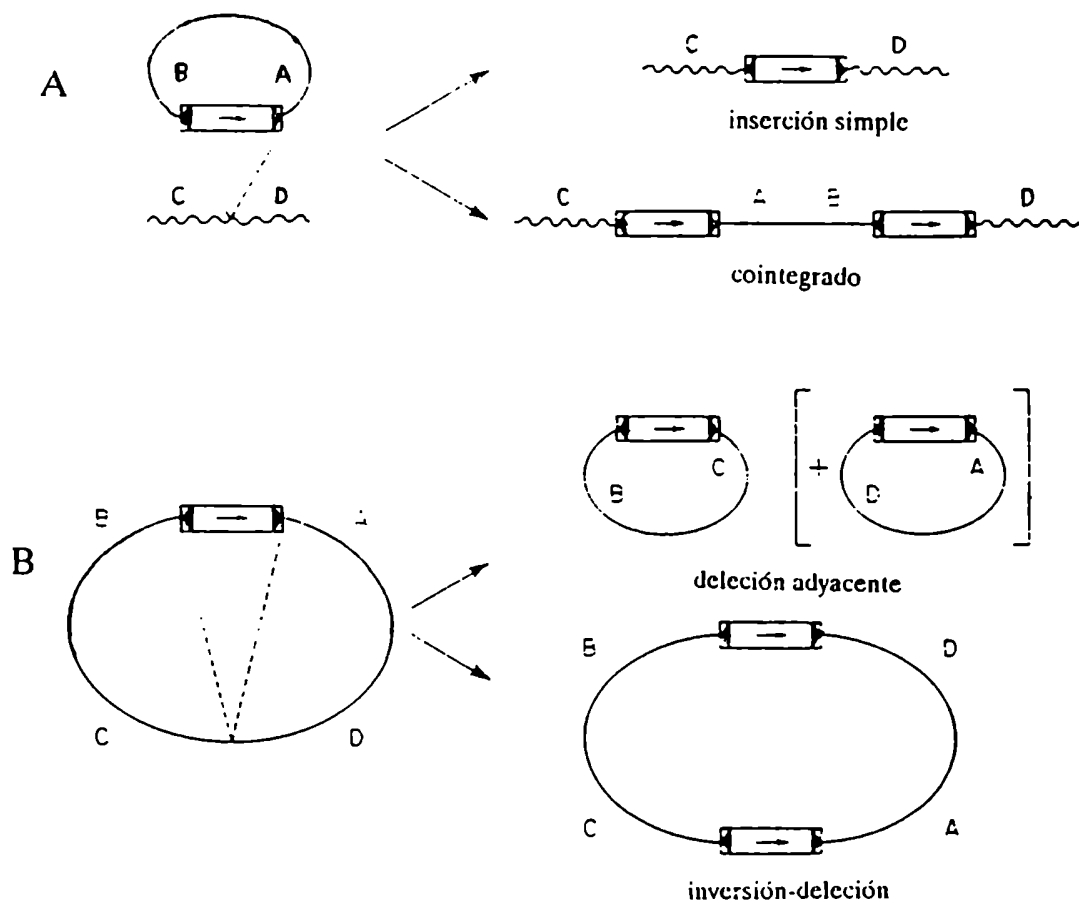


Figura 4. Rearreglos promovidos por transposones. A- Por eventos de transposición se pueden originar inserciones simples o cointegrados. B- Por transposición intramolecular se pueden producir deleciones adyacentes o inserción-inversión.

Los transposones presentan algunas características generales, comunes a casi todos ellos. Una de estas características es la presencia de repeticiones invertidas (IR) de secuencias en sus extremos (con excepción de Mu y Tn554, cuyas propiedades de integración asemejan las de bacteriófagos lisogénicos) (64). Las IR son secuencias idénticas e invertidas que constituyen los sitios específicos utilizados en el proceso de transposición, y varían en longitud y grado de conservación entre diferentes transposones. Los transposones también se caracterizan (excepto Tn554) por duplicar un segmento corto (3 a 13 pb) del ADN blanco en el sitio en el que se insertan, quedando una copia del fragmento duplicado unida a cada extremo del transposón insertado.

Los transposones procarióticos han sido clasificados en clases:

1. secuencias de inserción y transposones compuestos
2. familia de transposones del tipo de Tn3, dividida en subgrupo de Tn3, y subgrupo de Tn501
3. bacteriófago Mu y fagos relacionados

Esta clasificación es una simplificación, que no incluye a un gran número de elementos que no presentan características correspondientes a ninguno de los tres grupos. La Tabla II describe algunos transposones no clasificados.

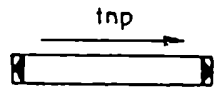
Tabla II. Transposones no clasificados.

Transposón	fenotipo	tamaño (kpb)	bacteria o plásmido de donde se aisló	referencia
Tn7	T ^r Sm ^r Sp ^r	13,5	R483	116
Tn554	Sp ^r Em ^r	6,2	<i>S. aureus</i>	64
Tn917	Em ^r	15	<i>Streptococcus faecalis</i>	178
Tn4653	metabolismo de tolueno	70	<i>Pseudomonas putida</i>	183

I-2.1 Secuencias de inserción y transposones compuestos.

Las secuencias de inserción son elementos transponibles pequeños (750pb-1.600 pb), que poseen solo uno o dos genes que codifican proteínas relacionadas a recombinación transposicional, y tienen IR en sus extremos. Las IS pueden encontrarse solas, siendo constituyentes naturales de cromosomas bacterianos, o en pares (con la misma u opuesta orientación) en cuyo caso, junto con las secuencias de ADN que comprenden, forman los transposones compuestos (Fig. 5). En este último caso la información para transposición sigue estando codificada en las IS, las cuales son además capaces de transposición independiente (95). Algunos ejemplos de transposones compuestos son: Tn9 (contiene dos IS1), Tn5 (contiene dos IS50) y Tn 903 (contiene dos IS903). Cabe destacar que para los transposones compuestos la frecuencia de transposición es inversamente proporcional al tamaño del fragmento de ADN comprendido entre las IS (al menos en el caso de IS1).

IS



Transposón compuesto

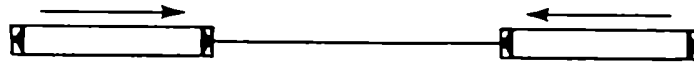


Figura 5. Esquema de la estructura de secuencias de inserción y transposones compuestos.

Las IS son elementos demasiado diferentes entre sí como para permitir generalizaciones, sin embargo cada una de ellas codifica para una proteína capaz de unirse a ADN (197), que cumple funciones de transposasa. Estas transposasas actúan eficientemente solamente en *cis*, no pudiendo ser complementadas en *trans*, por lo que se supone que se unen a las IR del elemento apenas transcritas o durante su transcripción (54). En algunos casos (p.e. IS1, IS50) se ha identificado además un segundo producto proteico, que cumple presuntamente funciones regulatorias de la transposición.

En todos los casos las IS producen primordialmente inserciones simples, pero se ha podido detectar para algunas de ellas formación de cointegrados estables (88), ésto mantuvo durante mucho tiempo un interrogante acerca de si el mecanismo de transposición de estos elementos es o no replicativo (ver sección I-2.4.). Actualmente se sabe que para algunas IS el mecanismo de transposición es no replicativo (16), transcurriendo por escisión del elemento de la molécula en que se encuentra e inserción en otra; mientras que para otras IS es un mecanismo replicativo en el cual, a través de la formación y resolución de un cointegrado, se forman los productos: una molécula donora que conserva una copia del transposón y una molécula aceptora que ha ganado la otra copia del elemento (75)

Los transposones compuestos, que contienen cuatro extremos (cuatro IR) de IS pueden dar transposición del elemento completo, o, a partir de la interacción de los dos extremos mas internos de sus IS, permitir un mayor repertorio de rearrreglos. En el caso de transposición intermolecular utilizando estos extremos resultaría la inserción (por inserción simple) del "transposón inverso", es decir que se transpondrían todas las secuencias de la molécula de ADN donora, excepto aquellas contenidas entre las IS en el transposón compuesto original. En el caso de transposición intramolecular resultaría o una delección-inversión o una delección adyacente (Fig. 6).

Muchos de estos transposones se insertan al azar en secuencias blanco, otros lo hacen preferentemente en secuencias blanco determinadas.

Los transposones compuestos frecuentemente codifican resistencia a ABs en la región interIS, siendo por lo tanto agentes diseminadores de esas resistencias (88); otros comprenden secuencias involucradas en la producción de toxinas.

I-2.2. Bacteriófago Mu.

Mu es un fago cuyo ADN es una molécula lineal de 38 kpb formada por 36 kpb de Mu y aproximadamente 1,5 kpb de ADN del huésped en uno de sus extremos y 50-150 pb de ADN del huésped en el otro. Cuando ingresa a una célula huésped su ADN forma un círculo que se mantiene cerrado no por unión covalente de sus extremos sino por acción de proteínas. En esta situación el fago puede seguir uno de dos ciclos de vida: insertarse en el cromosoma bacteriano en forma estable (ciclo lisogénico) o reproducirse y destruir a las células (ciclo lítico). La integración al cromosoma es un proceso de transposición conservativa (75), mientras que la replicación durante el ciclo lítico ocurre por transposición replicativa (125) (ver sección I-2.4.), de donde se puede concluir que el bacteriófago Mu es un transposón gigante encerrado en la cubierta de un virus.

Para la transposición de Mu se requieren sus dos extremos intactos, dos proteínas codificadas por los genes Mu-A y Mu-B del fago, y una proteína del huésped, HU, cuya función no se conoce exactamente. El fago Mu codifica además de estas proteínas para su transposición las proteínas estructurales de su cubierta. Su transposasa (también llamada proteína Mu-A) reconoce tres secuencias en cada uno

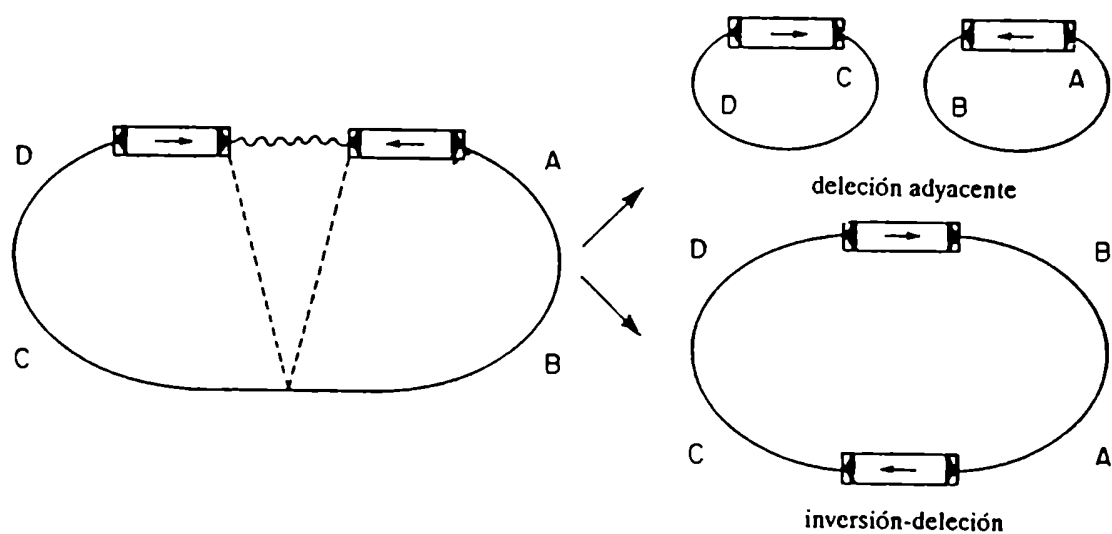


Figura 6. Rearreglos promovidos por transposones compuestos. Por interacción de los extremos internos de las IS que componen un transposón compuesto con una secuencia blanco intramolecular puede resultar una delección adyacente o una delección inversión, dependiendo de la orientación de las secuencias.

de los extremos del fago. Dichas secuencias están distribuidas en forma diferente en ambos extremos, siendo la distancia que las separa importante para el reconocimiento por la transposasa. Este fago no posee IR, sin embargo cada uno de sus extremos consiste de un dinucleótido TG, y a 4 pb de él comienzan las primeras secuencias consenso, con lo cual los sitios de unión de Mu-A presentan cierta simetría (125). Dentro de las secuencias consenso existe una secuencia 5'-PurinaCGAAA(A)-3', que se encuentra también en los extremos de los transposones Tn3, Tn1000, Tn951 y IS101 pertenecientes a la familia Tn3, a las cuales la transposasa de Mu puede unirse específicamente sugiriendo una relación evolutiva entre ambos grupos (31). Se ha sugerido que la proteína Mu-A está compuesta por un dominio que comprende el extremo carboxi-terminal que es el que se une al ADN, y otro dominio que estaría involucrado en interacción con otras proteínas (18).

En la transposición de Mu, por acción de Mu-A y la proteína HU, se produce un complejo nucleoproteico o transpososoma de tipo I (168). Este está formado por ADN de Mu con sus extremos unidos por medio de las proteínas, creando una figura en ocho, ADN del vector en que Mu se encontraba, y las proteínas mencionadas.

Mu codifica también una proteína Mu-B, que contiene actividad ATPasa (125); esta proteína en presencia de ATP convierte al transpososoma de tipo I en un transpososoma de tipo II, en el cual el ADN blanco y los extremos del ADN de Mu son mantenidos unidos en el centro de la figura en ocho (Fig. 7). Este complejo libera los productos finales de la transposición.

En cuanto a la preferencia por secuencias blanco, Mu, independientemente de las secuencias flanqueantes previas, prefiere una secuencia blanco: Nucleótido-Pirimidina-G/C-Purina-Nucleótido. Se cree que esta especificidad se debe o bien a Mu-A o bien a la proteína HU.

El fago Mu, al igual que los transposones de la familia Tn3 duplica una pequeña secuencia de 5pb de ADN blanco al transponerse, lo cual constituye una evidencia mas de que ambos grupos tienen un origen evolutivo común. Otra semejanza entre ambos es la "inmunidad" de blanco, es decir, el fenómeno por el cual la reacción de transferencia del transposón ocurre con baja frecuencia para moléculas blanco que contengan secuencias de ADN de sus extremos. En el caso de Mu la inmunidad está asociada a una distribución diferencial de la proteína Mu-B, que en presencia de ATP y Mu-A se disocia preferencialmente de moléculas de ADN inmunes (3,4).

El ciclo de vida del fago Mu comienza cuando infecta a una célula bacteriana y su transposasa dirige su transposición desde los extremos de ADN bacteriano que lo flanquean a sitios en el cromosoma. Los extremos abandonados por Mu son probablemente degradados por nucleasas celulares. Si Mu sintetiza suficiente cantidad de proteína represora se reprime la síntesis de su transposasa y las copias de Mu integradas permanecen en el genoma como profago. Por el contrario, si el represor no se sintetiza eficientemente se produce el ciclo lítico, en el cual se producen por transposición replicativa aproximadamente 100 copias de fago por célula en un lapso de una hora. Finalmente Mu es empaquetado en una cubierta proteica junto con fragmentos de ADN bacteriano en sus extremos, que serán diferentes, ya que el fago se había insertado en distintos sitios del genoma. El fago Mu es el transposón que transpone a mayor frecuencia en la naturaleza, asegurando su eficiente reproducción y mantenimiento.

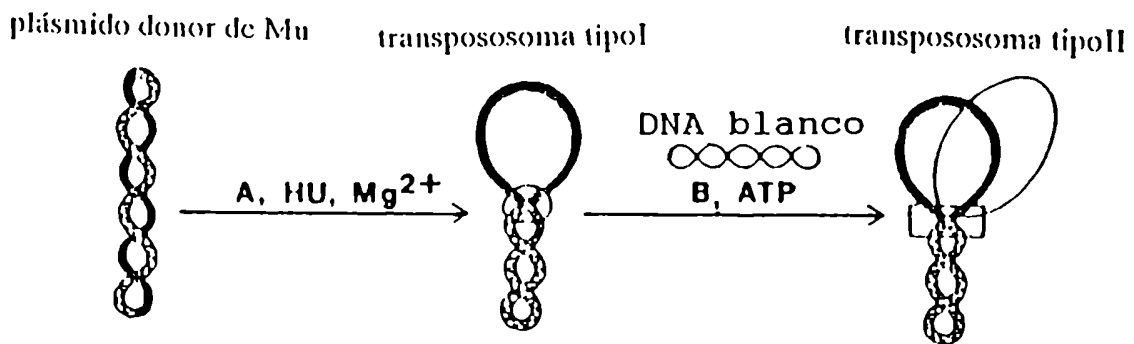
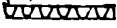

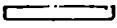


Figura 7. Esquema de transposición de Mu. Se esquematiza la transposición de Mu y sus intermediarios, los transpososomas de tipo I y tipo II. Tomado de Adzuma et al (3).

-  secuencias del plásmido dador de Mu
-  secuencias de Mu
-  secuencias de ADN blanco

I-2.3. Familia Tn3.

Este grupo está constituido por elementos transponibles de estructura muy similar, de los cuales el más conocido es Tn3. Todos ellos contienen un gen *mpA* que codifica una transposasa de aproximadamente 120.000 Da, y un gen *mpR*, que codifica una recombinasa sitio específica llamada resolvasa (21.000 Da). También poseen un sitio interno de resolución (IRS), y repeticiones invertidas en sus extremos de 38 pb cada una y secuencias relacionadas. Todos duplican 5 pb de la secuencia blanco al transponerse, y dan transposición por eventos replicativos en dos pasos. En el primero, por acción de la transposasa, se forma un cointegrado entre la molécula dadora y aceptora de transposón, con duplicación del mismo, y en el segundo ese cointegrado es resuelto por acción de la resolvasa, regenerando la molécula dadora inicial y la molécula aceptora, que ha ganado una copia del transposón (73)(Fig. 8).

Esta familia puede ser dividida en dos subgrupos en base a su organización genética y a la habilidad para complementarse de sus funciones de recombinación. Un subgrupo está formado por Tn3 y Tn1000 (anteriormente llamado $\tau\delta$). En los elementos de este subgrupo *mpA* y *mpR* se transcriben en forma divergente a partir de una región regulatoria compartida, y sus resolvasas son intercomplementables. Por el contrario, las transposasas de estos elementos no son intercomplementables, a pesar que sus IR (sitios reconocidos por transposasa) coinciden en 27 pb de sus 38 pb. En el otro subgrupo, cuyos miembros más conocidos son Tn501, Tn21 y Tn1721, la región de ADN que contiene IRS y *mpR* se encuentra invertida con respecto a su orientación en el subgrupo de Tn3 (Fig. 9), y en este caso tanto la resolvasa como la transposasa son intercomplementables (75). Probablemente el gen *mpR* sufrió una inversión en alguno de los dos subgrupos en su momento de divergencia evolutiva (74). Además de la inserción del transposón en una nueva molécula los elementos de esta familia pueden producir deleciones e inversiones de secuencias de ADN adyacentes, éstas resultarían como consecuencia del primer paso (fusión de replicones) en un evento intramolecular.

Los genes *mpA* de los transposones de la familia de Tn3 presentan alta homología. Todos codifican transposasas que resultan de la transcripción de las 3 kpb del gen *mpA* contenidas en el transposón más secuencias adyacentes, ya que la transcripción continúa a través de la IR a secuencias vecinas. La transcripción del gen *mpA* es reprimida por la enzima resolvasa, que limita la frecuencia de transposición del elemento. Esto puede constituir una forma del transposón de defender la vida del huésped, al cual necesita para perpetuarse, ya que al aumentar la cantidad de transposasa sintetizada aumenta la frecuencia de transposición y la probabilidad de dañar genes indispensables para la vida de la célula por inserción en ellos del transposón. Otra forma de defensa está dada por la vida media de la proteína transposasa, que es muy corta (dos horas) a 37°C. Si bien esta es la temperatura óptima para su acción (183), la frecuencia de transposición a 37°C es mucho menor que a 30°C (83).

Las transposasas de Tn3 y Tn1000 han sido purificadas a partir de células sobreproductoras (89, 126, 188). Se ha demostrado que estas proteínas se unen específicamente a las IR del transposón que las codifica, y no a las de ningún otro elemento, aunque presenten alta homología. Su especificidad de unión a IR está dada por una región de su extremo amino-terminal (56). Para la transposasa de Tn1000 se ha demostrado que su unión a IR es mutuamente cooperativa con una proteína del huésped IHF (factor de integración del huésped) (188), en un proceso ATP dependiente (89). Las transposasas de esta familia difieren notablemente de las de transposones compuestos e IS por su capacidad de actuar en trans.

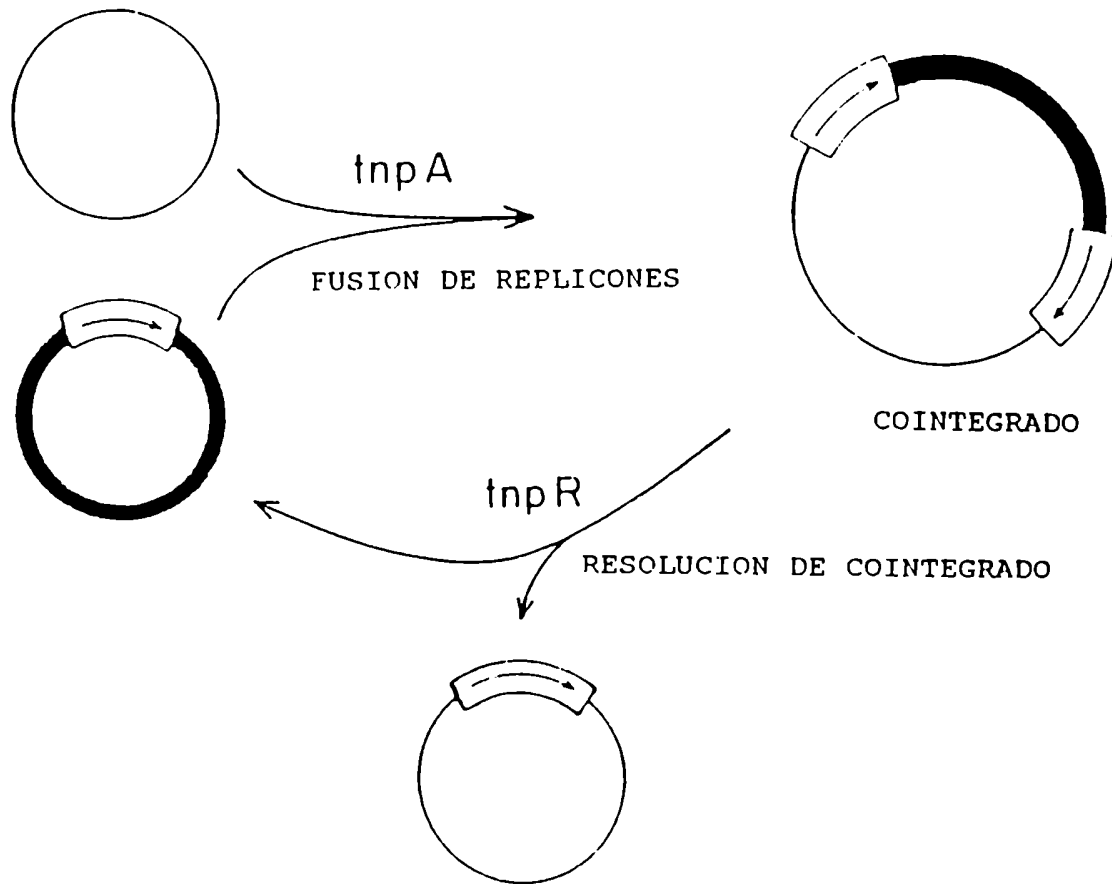


Figura 8. Transposición de Tn3. En un primer paso las moléculas de ADN blanco y dadora de transposón se fusionan en un proceso replicativo, por acción de transposasa, formando un cointegrado. Luego, por recombinación sitio específica entre las dos copias del transposón, mediada por resolvasa, se regenera la molécula dadora original y se libera la molécula aceptora con el transposón insertado.

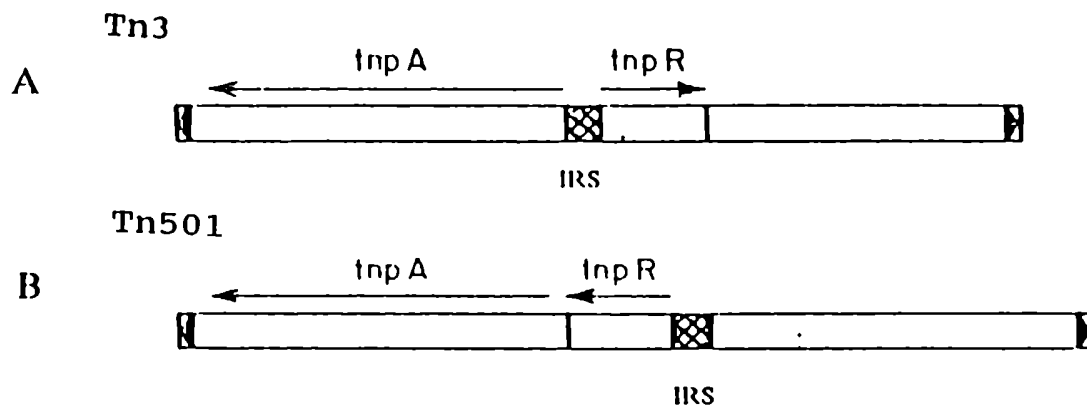


Figura 9. Estructura de transposones de la familia Tn3. Esquema de transposones de la familia Tn3. Se indican los genes *tnpA* (codificador de transposasa) y *tnpR* (codificador de resolvasa), el sitio de resolución (IRS), y las repeticiones invertidas (marcadas con puntas de flecha). A- Tn3, B- Tn501, representante del segundo subgrupo de la familia Tn3.

Los cointegrados formados por acción de transposasa son resueltos por la enzima resolvasa, en un proceso muy eficiente. Esta resolución ocurre específicamente en el sitio denominado sitio de resolución interna (IRS) del transposón. Los sitios IRS de Tn3 y Tn1000 han sido identificados como secuencias de por lo menos 130 pb, con diferencias entre algunas bases en ambos elementos. Dentro de ellos se ha detectado una secuencia de 19 pb rica en A-T, como el sitio de recombinación. Para la recombinación la resolvasa (que es capaz de actuar en trans) se une a los IRS de las dos copias de transposón y forma un complejo o sinaptosoma en el cual se presume que la distorsión del ADN favorece la ruptura y reunión de hebras de ADN (17). El sitio de ruptura endonucleolítica ha sido localizado entre la segunda T y A de una secuencia palindrómica TTATAA, dentro de los IRS. La resolvasa reconoce tres sitios en la región intercistronica entre *mpA* y *mpR*, de los cuales el primero corresponde a IRS y presumiblemente al operador de *mpA*, el segundo coincide con el operador de *mpR*, y el tercero se encuentra dentro de la secuencia codificadora de *mpR*. Para que haya resolución es necesario que la proteína se una a los tres sitios. Además de recombinación, resolvasa cumple funciones regulatorias sobre la transcripción de *mpA* y *mpR*.

Las resolvasas codificadas por transposones de la familia Tn3 no son los únicos sistemas de recombinación sitio específicos presentes en la naturaleza. El gen *mpR* de Tn3 presenta alta homología con el gen *lin*, involucrado en la inversión de secuencias que controla la expresión de diferentes antígenos flagelares en *Salmonella*. También está relacionado al sistema invertible *Gin* presente en Mu, que controla el rango de huéspedes, y a otro sistema *Cin* del bacteriófago P1; a un sistema relacionado con la estabilidad del plásmido R46 (55) y a *Pin*, que controla inversión de un segmento P en un plásmido (o posiblemente profago defectivo) aislado de *E. coli*. Se cree que todos estos sistemas tienen un origen común, sus resolvasas o invertasas presentan alta homología entre sí en sus dominios aminoterminales, que son los responsables de la actividad de recombinasa; sus dominios carboxi-terminales están poco conservados entre distintos subgrupos de complementación, y son los responsables de la unión a ADN (74).

El transposón Tn3 contiene, además de los genes involucrados en su transposición, un gen *bla* que codifica la β -lactamasa más comúnmente encontrada en bacterias G(-), confiriendo resistencia a Ap.

Existen dos miembros de la familia Tn3 conocidos como transposones parasíticos, que no codifican transposasa ni resolvasa. Uno de ellos, IS101, depende de los productos de *mpA* y *mpR* de Tn1000 para transponerse, y el otro, Tn951, codifica *lazZ* y *lacY* para metabolismo de lactosa, y presenta IR idénticos a los de Tn3, de cuyas transposasa y resolvasa depende para su transposición. Un miembro recientemente descrito y que da origen a una nueva subfamilia dentro de este grupo es Tn4430 (107). En su caso la resolución está a cargo de una proteína codificada por su gen *mpl*, que no pertenece a la familia de resolvasas-invertasas, sino que presenta gran similitud con la familia de integrasas (9) compuesta por *Int* de bacteriófago λ , con quien presenta homología de secuencias.

El subgrupo de Tn501 está formado por transposones muy relacionados en cuanto a sus funciones de transposición, pero que además codifican para resistencia a diferentes ABs. La estructura de algunos de sus miembros permite especulaciones evolutivas. Se cree que por inserción de determinantes genéticos para resistencia a ABs Tn501 podría haber originado a Tn21 y éste a Tn4, Tn2424 (122) y Tn2603 (171). Esta hipótesis es apoyada por la presencia de un sistema de recombinación sitio específica en Tn21 y transposones relacionados, que incluye un factor en trans (una proteína) y un sitio de recombinación (una secuencia de ADN específica) que constituiría un sitio preferencial para la integración de nuevas determinantes genéticos en secuencias cercanas a su gen *aadA* (113, 137, 167)(Fig. 10). De la misma manera, el alto grado de correspondencia entre las IR de Tn3 y de

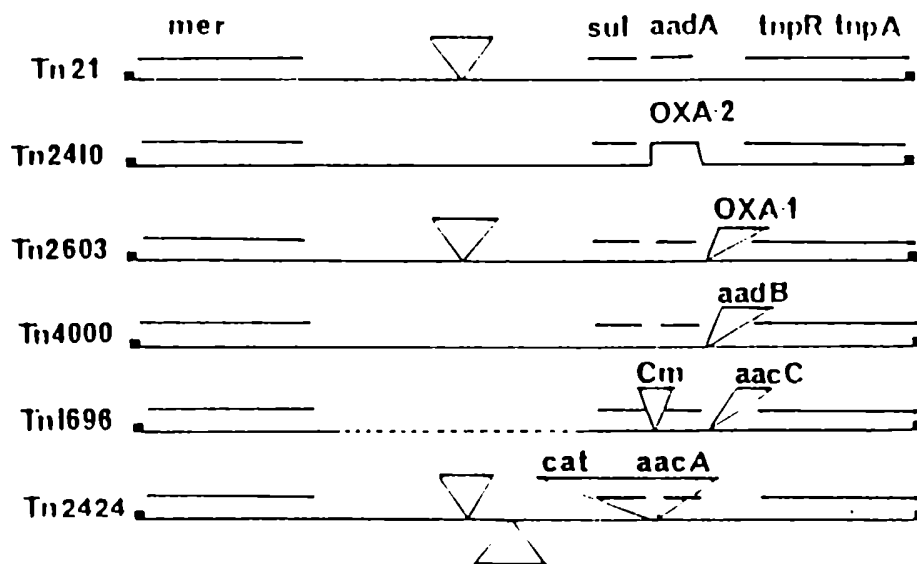


Figura 10. Esquema de transposones relacionados con Tn21. Se indican los genes de Tn21 para resistencia a mercurio (*mer*), sulfonamida (*sul*) y Sm/espectinomicina (*aadA*), también sus genes *tnpA* y *tnpR*. Se observa que las determinantes para resistencia en los transposones relacionados a Tn21 o bien reemplazan al gen *aadA* o bien se insertan 5' o 3' de este gen y no en otros sitios, indicando que el gen *aadA* está flanqueado por puntos de alta frecuencia de recombinación. Las líneas sin nombre corresponden a los genes iguales a los de Tn21. OXA-1 y OXA-2 son genes que codifican β -lactamasa, *aadB* codifica adeniltransferasa, *aacA* codifica acetiltransferasa (capaz de inactivar Ak), *cat* codifica CAT y Cm indica secuencias responsables de resistencia a Cm.

los transposones Tn917 y Tn551, aislados de *Staphylococcus* y *Streptococcus* respectivamente, y el hecho que generen duplicación de 5 pb de la secuencia blanco al insertarse, hace pensar que todos provienen de algún antecesor que por divergencia generó elementos transponibles extendidos tanto a bacterias G(-) como G(+) (141). El aislamiento de transposones de este tipo a partir del cromosoma de cepas productoras de ABs (135) sugiere que ellos podrían haber sido los vehículos mediante los cuales los genes de resistencia a ABs accedieron a bacterias que no los producen. Algunos transposones del subgrupo de Tn21, como Tn1721 y Tn1771, muestran amplificación de secuencias que codifican resistencia a ABs, la posibilidad de amplificar estas secuencias les aportaría ventajas en condiciones de presencia de ABs, y tiene por lo tanto importancia clínica.

Una característica de los transposones de la familia Tn3 es que presentan "inmunidad", es decir que la frecuencia de inserción de un transposón de este tipo en un plásmido que ya contenga una copia del mismo se ve reducida en 10^{-3} a 10^{-6} con respecto al mismo plásmido sin transposón. La presencia de un sola IR en una molécula de ADN es suficiente para conferirle inmunidad (72, 89). La especificidad de la inmunidad es la misma que la de transposición (11), es decir que Tn3 no confiere inmunidad a Tn1000 y viceversa.

I-2.4. Mecanismo de Transposición.

Si bien se han propuesto numerosos modelos de mecanismo de transposición, el propuesto por Shapiro en 1979 (160) es el más aceptado. Este modelo propone un proceso de transferencia de una hebra de ADN del transposón al ADN blanco, que se iniciaría en ambos extremos del transposón (Fig. 11) y podría involucrar ya sea los extremos 5' o 3' del mismo. Para el caso de Mu se ha demostrado que son los extremos 3' del transposón los que se transfieren (37), y se cree que lo mismo ocurre para IS. Esta unión del transposón a la secuencia blanco forma dos horquillas de replicación (Fig. 11-II). En el modelo original se producía replicación de ADN a partir de ambos extremos hasta que el transposón completo había sido replicado (Fig. 11-III) y finalmente el ADN replicado se unía a secuencias flanqueantes en cada extremo, generando un cointegrado (Fig. 11-IV). Las inserciones simples se explicaban como productos de recombinación sitio específica del cointegrado (Fig. 11-V), lo cual es cierto para transposones del tipo de Tn3, pero no explica las inserciones simples no replicativas.

En 1980 Ohtsubo (75) propuso una modificación al modelo de Shapiro, según la cual se inicia síntesis reparadora a partir de los extremos del ADN blanco y las hebras simples de la molécula dadora de transposón son desplazadas, siendo entonces susceptibles de ruptura (quizás por la actividad 5' exonucleasa de ADN polimerasa I). Esto resulta en una inserción simple, no replicativa (Fig. 11-VI, VII).

Este modelo permite explicar la formación de inserciones simples y de cointegrados. En el último caso se requiere un replisoma completo en las uniones terminales del transposón. Quizás sea la eficiencia de ensamblaje del replisoma, influenciada por factores del elemento transponible, la que decida el tipo de transposición (replicativa o no) que se produce.

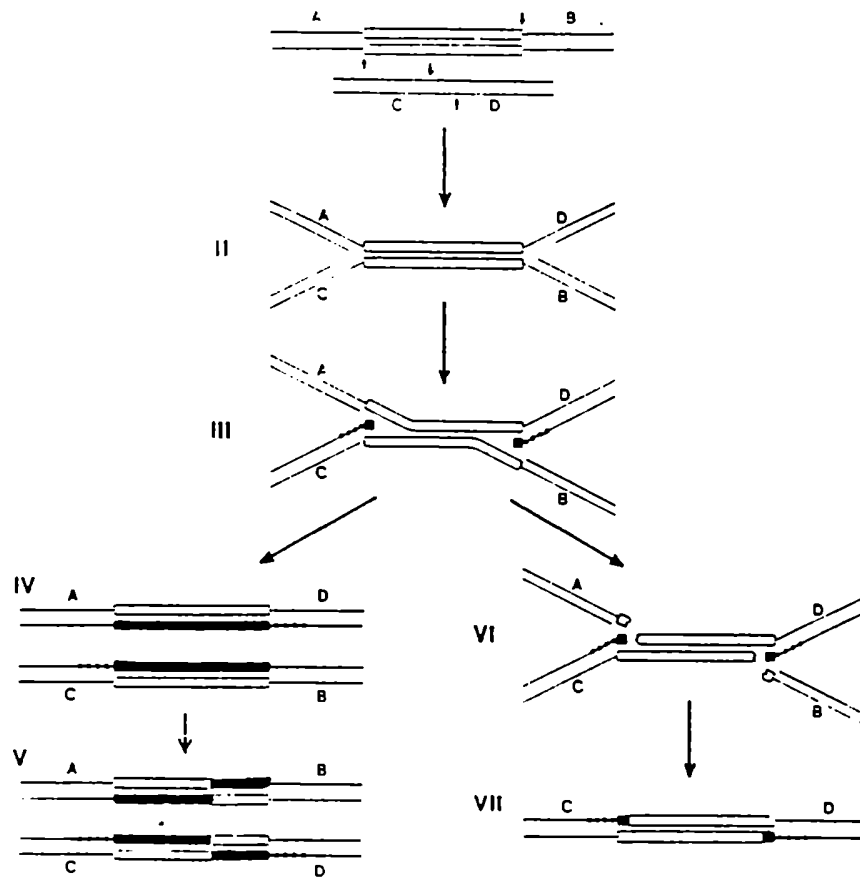


Figura 11. Esquema de transposones relacionados con Tn21. Se indican los genes de Tn21 para resistencia a mercurio (*mer*), sulfonamida (*sul*) y Sm/espectinomicina (*aadA*), también sus genes *mpA* y *mpR*. Se observa que las determinantes para resistencia en los transposones relacionados a Tn21 o bien reemplazan al gen *aadA* o bien se insertan 5' o 3' de este gen y no en otros sitios, indicando que el gen *aadA* está flanqueado por puntos de alta frecuencia de recombinación. Las líneas sin nombre corresponden a los genes iguales a los de Tn21. OXA-1 y OXA-2 son genes que codifican β -lactamasa, *aadB* codifica adeniltransferasa, *aacA* codifica acetiltransferasa (capaz de inactivar Ak), *cat* codifica CAT y Cm indica secuencias responsables de resistencia a Cm.

I-3. Evolución de resistencia a aminoglicósidos.

Se han encontrado mecanismos de resistencia a AGs en microorganismos que no provienen de aislamientos clínicos, tanto codificados en el cromosoma como en plásmidos y transposones. Durante muchos años se ha sabido que existen genes que codifican para resistencia a ABs desde antes que estas drogas comenzaran a usarse. Se ha especulado que el conjunto de genes responsables de conferir resistencia a AGs podría provenir de microorganismos que los utilizaran en vías metabólicas de azúcares o aminoácidos; o de organismos productores de ABs que se valieran de estos genes para protegerse de las drogas durante su síntesis (50, 61). Esta última hipótesis es la más aceptada actualmente, ya que existen evidencias de la presencia de genes para resistencia a AGs relacionados, en cepas productoras de los mismos y en cepas provenientes de aislamientos clínicos (48). La homología entre estos genes generalmente no es suficiente como para detectar su relación por hibridación con sondas o por reacciones cruzadas de anticuerpos contra sus productos, sino solamente por comparación de secuencias génicas o de las estructuras deducidas de las proteínas que codifican (6, 26, 51, 103). Por esto se considera que los genes deben haber pasado de las cepas productoras a otras hace largo tiempo, y que han seguido siendo modificados luego por mutaciones que no alteran su función (68). Surge el interrogante acerca de cómo esos genes se mantuvieron durante tantos años en bacterias no productoras de AGs cuando todavía no se empleaban ABs y por lo tanto no había una fuerte presión de selección. Se cree que microorganismos del suelo, sometidos a la acción de ABs producidos por cepas vecinas, mantuvieron estos genes.

En cuanto a la forma en que genes originalmente existentes en cromosomas de microorganismos productores fueron diseminados, la existencia de plásmidos y transposones ofrece una excelente explicación. Supuestamente los genes para resistencia habrían sido trasladados por transposones a plásmidos (146) y por medio de ellos (33) o por sí mismos cuando son conjugativos, a otras células. Actualmente se conocen transposones relacionados (100) que difieren solamente en secuencias responsables de resistencia a ABs. *Tn21* es un caso para el cual se han detectado dos puntos de alta frecuencia de recombinación, uno de ellos formando parte de un sistema de integración (113, 137). Naturalmente se han incorporado numerosas secuencias en estos puntos (167, 171) generando transposones que han ganado determinantes genéticos, en algunos casos relacionadas con resistencia a ABs (185). Se han detectado también transposones dentro de las secuencias de otros transposones (184), este tipo de transposiciones puede generar "bloques" de genes codificadores de resistencia a varios ABs (86, 112).

Se ha demostrado también que genes provenientes de microorganismos G(+) pueden expresarse en bacterias G(-) (141) y que existe pasaje de plásmidos (86) de microorganismos G(+) a G(-) por conjugación (138, 151). Esto ofrece apoyo a la hipótesis mencionada que supone pasaje de genes codificadores de resistencia de microorganismos productores G(+) a bacterias G(-).

Aceptando este origen para las determinantes de resistencia a ABs, cabe destacar que el mal uso de estas drogas ha llevado a la diseminación extraordinariamente rápida de resistencia en los últimos años (181), mediada por plásmidos (194) y transposones (169). También se ha favorecido a cepas que tienen aumentada la expresión de las determinantes para resistencia, ya sea por amplificación de los genes involucrados, mutaciones que aumenten el número de copias del plásmido que los contiene o adquisición de múltiples copias de un transposón portador de los mismos (62).

II- MATERIALES Y METODOS.

II-1. Bacteriología.

II-1.1. Microorganismos y condiciones de cultivo.

Las cepas bacterianas y plásmidos empleados se describen en las Tablas III y IV, respectivamente.

Tabla III. Cepas bacterianas.

cepas bacterianas	características relevantes	referencia
<i>E. coli</i> C2110	polA rha his Nal ^r Rif ^r	101
<i>E. coli</i> DS410	mutante de <i>E. coli</i> K12 formadora de minicélulas	152
<i>E. coli</i> HB101	pro leu thi lac hsr hsm endA recA rpsL20	24
<i>E. coli</i> LE392	hsdR514 supE44 supF58	98
<i>E. coli</i> SS320	azi-9 pro-48 lacZ118 lacI22 trpA9705 his-85 gyrA19 rpsL171 metE70 trp55 Obtenida por curado de un plásmido de 60MDa de la cepa KL320	19
<i>E. coli</i> V517	f fuente de ADN de plásmidos usados como referencia en EGA	106
<i>K. pneumoniae</i> FC1	Ak ^r Ap ^r Cm ^r Km ^r Mz ^r Tm ^r Sm ^r	174, esta tesis
<i>K. pneumoniae</i> JHCK1	Ak ^r Ap ^r Gm ^r Km ^r Tm ^r	193
<i>K. pneumoniae</i> JHCK4	Ak ^r Ap ^r Gm ^r Km ^r Tm ^r	193

Tabla IV. Plásmidos.

<u>plásmido</u>	<u>características relevantes</u>	<u>referencia</u>
pBR325	Ap ^r Cm ^r Tc ^r replicón pMB1	21
pHH1313b	codifica adeniltransferasa Gm ^r	153
pJHCA18	gen <i>cat</i> de pRI1234 clonado en pBR322	1
pJHCMW1	Ak ^r Ap ^r Km ^r Sm ^r Tm ^r	193
pJHCP4	Cm ^r Tc ^r Ap ^s derivado de pBR325 delecionado de determinantes para Ap ^r	140

Tabla IV. Continuación

<u>plásmido</u>	<u>características relevantes</u>	<u>referencia</u>
pJHCT00181	Ak ^r Ap ^r Km ^r Cm ^r Tm ^r fragmento Bam HI de 3kpb de pJHCMW1 clonado en pBR325	177
pJHCT15.2	Ak ^r Ap ^r Km ^r Cm ^r Tm ^r gen <i>aac</i> de pJHCMW1 clonado en pBR325 (Fig. 23)	177
pMB8::Tn1700	codifica acetiltransferasa Km ^r	153
pMET1	Ak ^r Ap ^r Km ^r Sm ^r Tm ^r Tra ⁺ Mob ⁺	174, esta tesis
pMET1 _d	derivado de pMET1 producido espontáneamente Ak ^r Ap ^r Km ^r Sm ^r Tm ^r Tra ⁺ Mob ⁺	esta tesis
pMET2.0	derivado Cm ^s de pJHCT15.2 delecionado de su gen <i>cat</i>	110, esta tesis
pMET2.1	derivado Cm ^s Ak ^s de pJHCT00181 delecionado del gen <i>cat</i> y parte de <i>aac</i>	110, esta tesis
pMET14	derivado delecionado de pJHCMW1 Ak ^r Km ^r Tm ^r Ap ^s carece de una IR (Fig.54)	176, esta tesis
pMET51	derivado de pJHCMW1 delecionado de parte de sus genes <i>mpA</i> y <i>aac</i> (Fig.54)	110, esta tesis
pPEM1	derivado de pMET1 delecionado del fragmento Eco RI de 20,5kpb y espontáneamente de un fragmento de 3kpb que contiene el gen <i>aac</i>	110, esta tesis
pPEM1.2	derivado de pMET1 delecionado del fragmento Eco RI de 20,5kpb	110, esta tesis
pPEM1.3	derivado de pPEM1.2 amplificado en un fragmento de 3kpb que contiene el gen <i>aac</i>	110, esta tesis
pPEM9	Ap ^r Cm ^r gen <i>bla</i> de pMET1 clonado en pJHCP4	174, esta tesis
pPEM10	derivado de pPEM1.2 por inserción del gen <i>cat</i> de pJHCA18 Ap ^r Ak ^r Cm ^r Km ^r Tm ^r Tra ⁻ Mob ⁺	174, esta tesis
pRK231	codifica fosfotransferasa Km ^r	77
pRK2013	Km ^r Tra ⁺ Mob ⁺	61
pROX1	Ak ^r Ap ^r Km ^r Cm ^r Tm ^r fragmento Bam HI de 3kpb de pMET1 clonado en pBR325	174, esta tesis
pROX2	fragmento Bam HI de 42 kpb de pMET1 portador de funciones de replicación	174, esta tesis
pROXT1	fragmento Eco RI de 2.3 kpb de pJHCMW1 portador de funciones de replicación ligado al fragmento Eco RI Km ^r de pUC4K	174, esta tesis
pSShe	contiene gen <i>mpA</i> de Tn3	165
pUC4K	Ap ^r Km ^r replicón pMB1	Pharmacia
pVK102	Km ^r Tc ^r replicón Rk2 Tra ⁻ Mob ⁺	96

Tabla IV. Continuación.

<u>plásmido</u>	<u>características relevantes</u>	<u>referencia</u>
RSF1050 511	Ap ^r ColE1 ^{im} derivado de RSF1050 de- leccionado en el gen <i>mpA</i> resultando Tn3 511	84
RSF2124	Ap ^r ColE1 con inserción de Tn3	164

ColE1^{im}, inmunidad a ColE1; Tra⁺, conjugativo; Tra⁻, no conjugativo; Mob⁺, movilizable.

El medio de cultivo utilizado habitualmente fue medio L, compuesto por 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl por litro de agua. El medio sólido contiene además 1,5 g de agar-agar por cada 100 ml de medio de cultivo. Los antibióticos se agregaron en las siguientes concentraciones: Ap, 500 µg/ml; Ak, Gm, Km, Tm, 25 µg/ml; Cm, 30 µg/ml; Nal, Sm, 50 µg/ml; Tc, 20 µg/ml.

El medio de cultivo selectivo BTB consta de medio L-agar adicionado con 0,008% de azul de bromotimol y 1% de lactosa. En él las bacterias que utilizan lactosa producen viraje del indicador al amarillo, las que no lo hacen no alteran el color azul.

El medio mínimo M9 (124) contiene 6 g de Na₂HPO₄, 3 g de KH₂PO₄, 0,5 g de NaCl y 1 g de NH₄Cl por litro de agua, su pH es 7,4; en el momento de usarlo se agregan 2 ml de 1M MgSO₄, 10 ml de 20% glucosa y 0,1 ml de 1 M CaCl₂ por cada litro de medio.

El medio BHI (infusión cerebro corazón) usado fue de Difco Labs. y se preparó de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Los cultivos fueron siempre a 37°C, con agitación a 200 rpm cuando se trataba de cultivos en medio líquido. Las células se cosecharon por centrifugación a 10.000xg durante 5 min.

Las cepas bacterianas se conservaron en medio L conteniendo 20% glicerol, a -70 C.

II-1.2. Preparación de extractos de *E. coli*.

a- presión: células cosechadas de 30 ml de cultivo se resuspendieron en 10 ml de 0,5M MgCl₂, se agregó desoxiribonucleasa y se procedió a la ruptura de las células por efecto de presión en French-Press. Se centrifugó a 100.000xg durante 60 min a 4°C y se usó el sobrenadante.

b- ultrasonido: células cosechadas de 10 ml de cultivo se resuspendieron en 2 ml de 0,5 M MgCl₂ y se sometieron a sonicación (15 kHz) durante 15 segundos tres veces, en hielo. Se centrifugó a 100.000xg durante 60 min a 4°C y se utilizó el sobrenadante (78).

c- shock osmótico: células cosechadas de 5 litros de cultivo se resuspendieron en 1,5 litros de 20% sacarosa, se incubó a 28°C con agitación a 200 rpm durante 60 min y se volvió a cosechar las células. Luego de eliminar todo el

sobrenadante (con ayuda de un hisopo) se resuspendieron rápidamente en 50 ml de 0.5 M MgCl₂, agitando en Vortex y con una varilla. La suspensión se centrifugó a 40.000xg durante 20 min a 4 °C y se usó el sobrenadante (78).

II-1.3. Conjugación.

Las conjugaciones se efectuaron en medio sólido L-agar (53), se sembraron cantidades aproximadamente iguales de las cepas intervinientes (salvo que se indiquen otras proporciones) se mezclaron con ansa y se incubaron a 37 °C durante 12-16 horas (salvo que se indique otro lapso). La mezcla de conjugación se resuspendió en 1 ml de medio L y se sembró 0,1 ml de suspensión en medio selectivo sólido. Cuando se deseaba conocer la eficiencia de conjugación se sembraron también 0,1 ml de diluciones progresivas de la suspensión en medio de cultivo sólido y se contaron las colonias formadas (174).

II-1.4. Transformación.

Para su transformación se prepararon células competentes utilizando CaCl₂ (108). Partiendo de 25 ml de cultivo en fase logarítmica tardía (OD₅₅₀ aproximadamente 0,5) se cosecharon las células, se lavaron con 5 ml de solución de transformación (50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8,0), se volvió a cosechar y se resuspendieron en 1 ml de la misma solución. A 0,2 ml de esta suspensión se agregaron 0,3 ml de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) y 20 μl de solución de ADN en buffer TE. Luego de 40 min en hielo y shock térmico en baño de agua a 42 °C durante 5 min se agregaron 0,5 ml de medio I y se permitió a las células recuperarse por incubación a 37 °C durante 2 horas. Para la selección de transformantes se sembraron 0,1 ml de esta suspensión en medio de cultivo sólido conteniendo los ABs apropiados.

II-1.5. Minicélulas.

Células de *E. coli* DS410 transformadas con los plásmidos correspondientes según se describe en la sección II-1.4. se cultivaron a 37 °C durante 16 horas con agitación a 200 rpm y se cosecharon por centrifugación diferencial. Primero se separaron las bacterias de tamaño normal centrifugando a 3.000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se centrifugó a 8.000 rpm durante 15 min obteniendo un precipitado que contenía las minicélulas. Estas se purificaron por centrifugación en gradiente de sacarosa 5 a 20%, se cosecharon centrifugando a 10.000 rpm durante 10 min y se resuspendieron en 0,5 ml de medio M9. En este medio de cultivo se preincubaron a 37 °C durante 30 min y se adicionaron 0,2 ml (20 μCi) de mezcla NEC-445E de (¹⁴C)L-aminoácidos, se incubó 45 min más y se agregaron 0,5 ml de medio BHI. Luego de 10 min más de incubación se cosecharon

las minicélulas por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min (152). Se resuspendieron y se precipitaron las proteínas llevando a 10% de ácido tricloroacético. Estas muestras se sometieron a PAGE-SDS.

II-2. ADN.

II-2.1. Aislamiento de plásmidos.

Para el aislamiento de plásmidos se utilizó el método de Birnboim y Doly modificado (20), que promueve ruptura celular por tratamiento alcalino. Partiendo de 250 ml de cultivo de 12-16 horas de la cepa bacteriana se cosecharon las células y se resuspendieron en 5 ml de solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 5 mg/ml lisozima), y luego de 5 min a temperatura ambiente se agregaron 10 ml de solución 0,2 N NaOH, 1% SDS recién preparada. Después de 10 min en hielo el ADN cromosomal se precipitó por agregado de 7,5 ml de 5 M K_2Ac pH 4,8, se dejó 15 min en hielo y se separó por centrifugación a 15.000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante, que contiene el ADN de plásmidos se trató con 12 ml de isopropanol, y se dejó 20 min a temperatura ambiente para la precipitación del ADN. El ADN de plásmidos se separó por centrifugación a 10.000 rpm durante 20 min a 20°C, se lavó con 70% etanol y se secó al aire.

Para mayor purificación se sometió el ADN a ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio. Para ello al ADN se resuspendió en buffer TE, se le agregó cloruro de cesio hasta alcanzar un índice de refracción de aproximadamente 1,39 y bromuro de etidio para permitir la visualización del ADN por exposición a UV, y se centrifugó a 45.000 rpm durante 16-24 horas a 20°C. La banda de ADN de plásmidos se extrajo del gradiente por medio de una jeringa, se eliminó el bromuro de etidio por extracción con isopropanol saturado con cloruro de cesio y el cloruro de cesio por diálisis contra buffer TE durante 3 horas.

Para obtener cantidades pequeñas de ADN se utilizó el mismo método, pero partiendo de 1 ml de cultivo. Las células se resuspendieron en 100 μ l de solución I y en adelante se usaron cantidades proporcionales de reactivos. En este caso la precipitación del ADN de plásmidos se efectuó con etanol a -20°C, y se dejó precipitar durante 15 min a -70°C, separando el precipitado por centrifugación a 14.000 rpm durante 15 min en centrífuga Eppendorf. El precipitado se lavó con 70% etanol, se secó en bomba de vacío, y se resuspendió en 30-40 μ l de buffer TE. En un paso posterior de purificación se extrajo con igual volumen de 1:1 fenol:cloroformo, y luego con éter para eliminar restos de fenol. El éter se eliminó con bomba de agua y luego con bomba de vacío, y se precipitó nuevamente el ADN por agregado de 1/9 volúmenes de 3 M Na_2Ac pH 4,8 y 2,5 volúmenes de etanol a -20°C. Se dejó precipitar durante 15 min a -70°C y se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 min en centrífuga Eppendorf. El precipitado, que contiene el ADN de plásmidos, se enjuagó con 70% etanol, se secó en bomba de vacío y se resuspendió en 30-40 μ l de buffer TE.

II-2.2. Tratamientos enzimáticos.

Se emplearon enzimas de restricción, T4-DNA ligasa y DNA polimerasa I de Bethesda Research Lab. o de Boehringer Mannheim, efectuando las reacciones en las condiciones recomendadas por el fabricante y utilizando los correspondientes buffers comerciales.

Para la formación de quimeras se reunieron las mezclas de productos de digestión de los plásmidos de partida y se detuvo la reacción por agregado de igual volumen de 1:1 fenol:cloroformo. La fase acuosa se extrajo con éter y se continuó la purificación de ADN como se describe en II-2.1.. El ADN se resuspendió en buffer de ligación se trató con DNA ligasa durante 12 horas a 4°C y se utilizó para transformación de células.

II-2.3. Electroforesis en gel de agarosa (EGA).

Se utilizaron geles de agarosa 0,7% preparados por disolución por calentamiento de la agarosa en buffer TBE (0,089 M Tris-borato pH 8,0, 1mM EDTA) (108), conteniendo bromuro de etidio. Las muestras sembradas contenían una mezcla compuesta por 0,25% azul de bromofenol, 200 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 7,8 y 50% glicerol. Las electroforesis se efectuaron en buffer TBE, a 30 mA. El ADN se observó por exposición del gel a luz UV.

II-2.4. Transferencia de ADN a papel de nitrocelulosa.

Para la transferencia de ADN a papel de nitrocelulosa el ADN fue "arrastrado" del gel al filtro por medio de flujo de buffer (108). Para ello el gel de agarosa conteniendo los fragmentos de ADN se trató con 0,25 N HCl durante 15 min dos veces a fin de provocar una hidrólisis parcial del ADN, permitiendo a fragmentos grandes originar segmentos menores, capaces de unirse mas eficientemente a nitrocelulosa. Luego el ADN se desnaturalizó por tratamiento con 0,6 M NaCl, 0,2 M NaOH durante 20 min dos veces, y luego de lavar con agua deionizada se neutralizó por lavado en 0,2 M Tris-HCl pH 7,4, 0,6 M NaCl durante 30 min dos veces. El gel se colocó sobre papel Whatman 3MM, apoyado sobre un vidrio con sus extremos cayendo a ambos lados y sumergidos en un recipiente que contenía buffer 10xSSC (87,65 g NaCl, 44,1 g citrato de sodio, en 1 litro de agua, pH 7,0). Sobre el gel se colocó el filtro de nitrocelulosa mojado en 10xSSC y sobre éste papel absorbente formando una pila de 8 cm, y un peso. El buffer fluía del recipiente al papel absorbente, pasando por el gel y el papel de nitrocelulosa, y arrastrando los fragmentos de ADN, que se unían al papel de nitrocelulosa. Luego de 12-16 horas se retiró el filtro, se enjuagó rápidamente en 2xSSC, se dejó secar al aire y se incubó a 80°C durante dos horas.

II-2.5. Preparación de sondas radioactivas.

El fragmento de ADN escogido como sonda se obtuvo por digestión del plásmido correspondiente con enzimas de restricción, y separación de los productos por EGA utilizando agarosa de bajo punto de fusión. Por observación con luz UV se identificó la banda correspondiente al fragmento a usar y se cortó la porción del gel que la contenía. Se le agregaron 10 volúmenes de agua deionizada a 4°C y se dejaron a esta temperatura durante 2 horas para permitir la diálisis del bromuro de etidio del gel al agua. Se descartó el agua y en el momento de la reacción de marcación se calentó la agarosa conteniendo el ADN a 100°C durante 10 min. Este tratamiento desnatura el ADN y funde la agarosa, que al ser diluida en la mezcla de reacción, y dado que ésta transcurre a 37°C, no vuelve a solidificar. Para la marcación se transfirió el volumen de ADN en agarosa calentado que fuera necesario (5-10 μ l).

La marcación se efectuó utilizando los fragmentos de ADN obtenidos como se acaba de describir en técnicas de "nick translation" (150) o de "random priming" (58), utilizando equipos comerciales de Bethesda Research Lab. y de Boehringer Mannheim, respectivamente, y de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes. Se usó también en cada caso un (α - 32 P)dATP.

La técnica de nick translation se basa en la capacidad de DNA polimerasa I de adicionar nucleótidos a hidroxilos 3' libres presentes en moléculas de ADN en que al menos una de las hebras ha sido cortada, y de remover nucleótidos de extremos 5' libres. Por eliminación de nucleótidos del extremo 5' y adición de nucleótidos a los hidroxilos 3' que resultan, en el fragmento de ADN preparado como se indicó, en forma secuencial, se forman moléculas de ADN que han incorporado nuevos nucleótidos. Si la incorporación transcurre en presencia de un (α - 32 P)dNTP las moléculas de ADN tratadas contendrán 32 P.

La técnica de random priming utiliza una mezcla de todos los hexanucleótidos posibles, de los cuales algunos serán complementarios al fragmento de ADN, usado como molde. Al poner en contacto el ADN molde desnaturizado con los oligonucleótidos éstos se unen a secuencias complementarias del molde y a partir de sus extremos 3' hidroxilo se sintetiza ADN por acción del fragmento mayor de DNA polimerasa I y utilizando los cuatro dNTP, de los cuales uno contiene 32 P en su fosfato α .

II-2.6. Hibridación.

Para la hibridación se trató el filtro conteniendo los fragmentos de ADN con una mezcla de 50% formamida, 0,1% SDS, 5xSSC, 1 mM EDTA, 1% solución Denhardtts (50% solución Denhardtts es 1 g Ficoll, 1 g polivinilpirrolidona, 1 g seralbúmina bovina, por cada 100 ml de agua deionizada), durante 2 horas a 37°C. Se agregó el ADN sonda junto con 1ml de 100 μ g/ml ADN de esperma de salmón, desnaturizados por calentamiento a 100°C durante 10 min y se incubó a 37°C durante 12-16 horas. El ADN unido inespecíficamente se eliminó por lavado dos veces con 5xSSC, 0,1%SDS durante 15 segundos, y luego cuatro veces durante

15 min en el mismo buffer a 60°C. El filtro se secó al aire y se colocó sobre una película radiográfica en oscuridad para obtener una autorradiografía, que se reveló en un plazo de 24-48 horas. El incremento de 1% en la concentración de formamida baja la temperatura de fusión del ADN en 0,7°C (115) por lo tanto las condiciones utilizadas son de alta estringencia.

II-3. Proteínas.

II-3.1. Determinación de enzimas modificadoras de AGs.

Para la determinación de EMAs se usó el método del papel de fosfocelulosa (78). Este método utiliza el sustrato distinto de AG marcado radioactivamente en el grupo que se va a transferir. El buffer de reacción era 125 mM citrato de potasio pH 6,8, 30 mM acetato de magnesio, 100 mM DTT para acetiltransferasa; y para adeniltransferasa y fosfotransferasa 70 mM Tris-maleico pH 7,1, 40 mM cloruro de magnesio, 400 mM cloruro de amonio, 1,5 mM DTT. Todos los ensayos se hicieron en un volumen final de 46 μ l, de los cuales 5 μ l correspondieron a solución 5 mg/ml del AG, 10 μ l a buffer de reacción, 30 μ l a la muestra que contenía EMA y 1 μ l al sustrato radioactivo. En el caso de acetiltransferasa este último era (1-¹⁴C)acetilCoA 530 μ Ci/ml, diluido con dos partes de 1 mg/ml acetilCoA; para adeniltransferasa, (¹⁴C)ATP 100 μ Ci/ml; y para fosfotransferasa, (γ -³²P) 75 μ Ci/ml. Las reacciones de acetilación y de fosforilación se llevaron a cabo a 37°C durante 30 min, la de adenilación a 30°C durante 20 min.

La reacción se detuvo poniendo los tubos en hielo. Se sembraron 40 μ l de cada mezcla de reacción en papel de fosfocelulosa Whatman P81, al cual los AGs se unen firmemente. Se esperaron 30 segundos. y se lavaron los papeles con agua deionizada a 70°C durante 5 min, y luego cuatro veces con agua a temperatura ambiente. Los papeles se secaron al aire y se determinó la radioactividad que contenían, como cpm, en contador de centelleo líquido.

Esta técnica fue modificada incorporando separación de los productos de reacción. Para ello se sembraron 40 μ l de mezcla de reacción en un extremo de una tira de papel de fosfocelulosa de 16x3 cm y se sometieron a cromatografía ascendente en agua deionizada. El papel se secó al aire, se repitió la cromatografía y se volvió a secar. La radioactividad presente a lo largo de la tira de papel se determinó en scanner, detectándose el exceso de sustrato radioactivo como un pico en el frente de corrida, y el AG modificado, radioactivo, como un pico en el lugar de siembra.

II-3.2. Cromatografía de intercambio aniónico.

Se utilizó una columna de 17 ml empaquetada con DEAE-sephacel y equilibrada con buffer 20 mM Tris-HCl pH 7,8. La elución se llevó a cabo con un gradiente de NaCl 0-0,6 M, a una velocidad de 0,2 ml/min, recogiendo fracciones de 1 ml.

II-3.3. Cromatografía de afinidad.

Se utilizó una columna de 1 ml empaquetada con Sepharosa4B-Ak. La resina se preparó activando Sepharosa4B con bromuro de cianógeno, mediante tratamiento de 2 g de la misma con 1 mM HCl durante 15 min, eliminación del sobrenadante y lavado reiterado con 1 mM HCl hasta obtener un volumen total de 400 ml. El gel se lavó con buffer de acoplado (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl) e inmediatamente se mezcló con solución de Ak en buffer de acoplado (10 mg Ak por ml de gel) y se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación. Se agregó agente bloqueante (1 M etanolamina pH 8) y se dejó a actuar durante 36 horas a 4°C con agitación. Se lavó la resina con buffer de acoplado, luego con buffer 0,1 M acetato de sodio pH 4, 0,5 M NaCl, y nuevamente con buffer de acoplado. La Sepharosa4B-Ak se conservó a 4°C (5).

II-3.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).

Las electroforesis desnaturalizantes de proteínas se efectuaron en forma vertical de acuerdo a condiciones previamente descritas (65). El buffer superior e inferior de corrida fue Tris-glicina pH 8,8, conteniendo 0.1% SDS. Las muestras se precipitaron con 10% ácido tricloroacético y luego de descartar cuidadosamente el sobrenadante obtenido por centrifugación se resuspendieron en 30 µl de una solución que contenía 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% β-mercaptoetanol y azul de bromofenol, calentando a 100°C durante 5 min.

Las proteínas se detectaron en los geles por coloración con 1,5% Coomassie blue R-250 en metanol-ácido acético-agua (45,5:9:45,5) durante 12-14 horas y posterior decoloración con metanol-HAc-agua (20:7:73). Las proteínas también fueron detectadas por el método de nitrato de plata en medio alcalino (132).

II-3.5. Determinación de proteínas.

Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry (105). Cuando la concentración de proteínas era insuficiente para determinarla por este método las muestras se liofilizaron y resuspendieron en menor volumen.

III-OBJETIVOS

Frecuentemente se producen infecciones intrahospitalarias debidas a cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*. Los antibióticos AGs constituyen un arma eficaz contra ellas, sin embargo la aparición de cepas resistentes se ha convertido en un problema de importancia clínica.

La forma mas frecuente de resistencia a AGs es la producción de enzimas modificadoras que los inactivan, siendo Ak el AG mas refractario a su acción. Sin embargo se han aislado cepas resistentes a Ak que codifican para enzimas modificadoras en genes presentes en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. En dos casos se encontró resistencia a Ak codificada en transposones, Tn2424 (122) y Tn1331 (176).

El objetivo de este trabajo es el estudio genético y bioquímico de la resistencia a Ak presente en cepas de *K. pneumoniae* responsables de una epidemia en el Hospital Lagomaggiore de la ciudad de Mendoza. Durante el transcurso del mismo y en base a los resultados encontrados se impuso comparar el plásmido codificador de resistencia a Ak proveniente de estas cepas, pMET1, con otro, pJHCMW1, aislado de cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes provenientes de una epidemia en el Hospital de Niños de la ciudad de Buenos Aires.

IV-RESULTADOS Y DISCUSION

IV-1. Antecedentes relacionados a resistencia a amikacina.

En 1985, Woloj et al (193) estudiaron 160 cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes del Hospital de Niños de Buenos Aires, que habían contraído infecciones intrahospitalarias entre enero de 1981 y enero de 1982. Todas eran resistentes a varios AGs y 7% de ellas resultaron resistentes a Ak.

Se analizaron particularmente dos cepas de *K. pneumoniae* aisladas a partir de líquido cefalorraquídeo de neonatos que murieron a causa de la infección. Cada una de ellas contiene siete plásmidos distintos, de diferentes tamaños. Por experimentos de conjugación se determinó que los plásmidos responsables de la resistencia a Ak son pJHCMW1 (de 11 kpb) en el caso de *K. pneumoniae* JHCK1 y pJHCMW4 (75 kpb) para *K. pneumoniae* JHCK4. Ambos confieren además resistencia a Ap, Km, Sm y Tm.

Se encontró también que tanto pJHCMW1 como pJHCMW4 codifican una actividad acetiltransferasa capaz de utilizar Ak, gentamicina (Gm), Km y Tm como sustratos. Estas enzimas serían las responsables de las resistencias a Ak, Km y Tm encontradas. La sensibilidad a Gm fue atribuida a que el balance entre el ingreso de Gm a la célula y su inactivación por acetilación permita concentraciones letales del aminoglicósido en el interior de la bacteria, como ha sido descrito en otros casos (66, 104, 148).

Tolmasky et al (177) analizaron genéticamente el plásmido pJHCMW1. En primer lugar clonaron un fragmento de ADN de este plásmido que contiene las determinantes genéticas para resistencia a Ak. Este clon confiere también resistencia a Km y Tm. Digiriendo el fragmento clonado con varias enzimas de restricción, determinaron su mapa físico. Construyeron varios derivados por delección del clon que contiene el gen responsable de resistencia a Ak, y también mutantes del mismo por inserción. La capacidad o no de estos derivados de conferir resistencia a Ak permitió acotar un fragmento de ADN de menor tamaño, que es el responsable de conferir resistencia a Ak, Km y Tm. Analizaron también las actividades enzimáticas contenidas en extractos celulares provenientes de bacterias portadoras de los distintos derivados. De esta forma determinaron que el fragmento responsable de Ak^r codifica para una acetiltransferasa capaz de modificar Ak, Gm, Km y Tm. La capacidad de esta enzima de modificar Gm, rindiendo un derivado inactivo de la misma no se refleja en resistencia de las células que la producen a ese aminoglicósido. Analizando las mutantes obtenidas por delección o inserción se observó que solamente aquellos derivados que codifican para la producción de acetiltransferasa son capaces de conferir resistencia a Ak, Km y Tm. Esto indica que la resistencia se debe a la acción de esta enzima. En todos los casos en que los derivados confieren resistencia a Ak, también lo hacen para Km y Tm. Cuando resultan incapaces de conferir resistencia a Ak, también lo son para Km y Tm. Resultaba probable, entonces, que el mismo gen codificara para resistencia a los tres AGs, pero no se podía descartar que se tratase de dos genes muy cercanos o superpuestos. Se continuaron los estudios, y en 1988, Nobuta et al (130) secuenciaron el gen codificador de acetiltransferasa, responsable de conferir resistencia a Ak, Km y Tm.

Tolmasky et al (177) compararon el mapa físico de la región de pJHCMW1 que contiene el gen responsable de conferir resistencia a Ak, con secuencias del transposón Tn2424, sin encontrar similitudes entre ambos. Tn2424 contiene determinantes genéticos para resistencia a Ak (122), y era el único elemento transponible portador de esta resistencia que se conocía hasta el momento.

En 1986, Tolmasky et al (176) demostraron que el gen responsable de conferir resistencia a Ak en pJHICMW1 se halla contenido en un transposón perteneciente a la familia Tn3, subgrupo Tn3, que denominaron Tn1331.

El interés particular por la resistencia a Ak, entre todos los AGs usados en clínica médica, se debe a que es el más refractario a inactivación por enzimas modificadoras (147). Hasta 1986 los casos de infecciones por bacterias resistentes a Ak reportados eran todavía muy pocos (102, 122, 127). Ese mismo año, entre el 28 de abril y el 6 de mayo, murieron al menos once recién nacidos prematuros a causa de septicemia por *K. pneumoniae*. La epidemia ocurrió en el Servicio de Neonatología del Hospital Lagomaggiore de la ciudad de Mendoza. El aislamiento de los niños infectados evitó la diseminación de la infección, previniendo consecuencias aún más graves.

Las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los pacientes eran todas multirresistentes y capaces de multiplicarse en presencia de Ak. El Director del Hospital Lagomaggiore, Dr. Luis Chrabalowsky, envió al Dr. Marcelo E. Tolmasky y al Dr. Luis F. Leloir cepas de *K. pneumoniae* provenientes de tres de los niños infectados. Estas cepas fueron empleadas para realizar estudios sobre resistencia a Ak, que se describen en esta tesis, al mismo tiempo que se continuaban los estudios sobre el mismo tema centrados en el plásmido pJHICMW1.

IV-2. Aislamiento de pMET1.

Las tres cepas de *K. pneumoniae* FC1 provenientes de diferentes pacientes, víctimas de la epidemia ocurrida en el Hospital Lagomaggiore de la ciudad de Mendoza durante 1986, fueron empleadas en estudios sobre resistencia a Ak.

Los antibiogramas correspondientes a estas cepas mostraban que todas eran resistentes a Ak, Km, Tm, fosfomicina, Ap, carbenicilina, mezlocilina, netilmicina, Cm y Tc, y parcialmente resistentes a trimetoprima y sulfametaxol; mientras que resultaban sensibles a cefotaxina, cefoxitina, piperacilina y gentamicina.

El primer paso consistió en determinar si las determinantes genéticas para resistencia a Ak se encontraban en el cromosoma de estas bacterias o en algún plásmido que ellas contuvieran. A fin de detectar la presencia de plásmidos, que pudieran contener los genes capaces de conferir resistencia a AGs, se preparó ADN plasmídico a partir de cada una de las cepas. Las preparaciones obtenidas fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa y se observó que cada una mostraba una única banda, correspondiente a un plásmido de 48 kpb (Fig. 12). Esto permite inferir que las tres cepas contienen un único plásmido cada una. Este resultado muestra una diferencia entre las cepas provenientes de Mendoza y las de Buenos Aires, las cuales contenían varios plásmidos cada una (193) (Fig. 12).

Los plásmidos provenientes de las tres cepas de *K. pneumoniae* producen además perfiles de restricción idénticos por digestión con distintas endonucleasas, sugiriendo que se trata del mismo plásmido. Estudios posteriores de mapeo de restricción y determinación de resistencia antibiótica codificada en estos tres plásmidos confirmaron que por los criterios empleados son idénticos. Es decir, que las tres cepas contienen en realidad el mismo plásmido, o, lo que es lo mismo; por los criterios utilizados por el laboratorio del hospital y por el contenido plasmídico, los tres pacientes fueron infectados por la misma cepa de *K. pneumoniae* denominada FC1. El plásmido aislado a partir de estas bacterias se denominó pMET1.

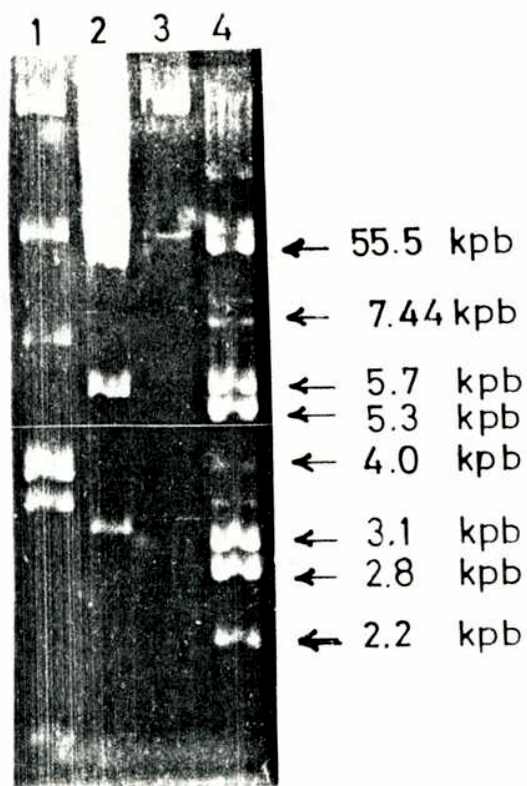


Figura 12. Plásmidos provenientes de cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*. Se purificaron los plásmidos contenidos en cepas de *K. pneumoniae*, y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (EGA). Las cepas empleadas fueron: línea 1, *K. pneumoniae* JHCK1; línea 2, *K. pneumoniae* JHCK4; línea 3, *K. pneumoniae* FC1 (aislada en Mendoza, en 1986). Se indica el tamaño de los plásmidos contenidos en *E. coli* V517, utilizados como marcadores de tamaño.

IV-3. Resistencias a antibióticos codificadas por pMET1.

Simultáneamente con el aislamiento de pMET1 se realizaron experimentos de transformación. Cada experiencia se efectuó con preparaciones de ADN provenientes de las tres cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes de la epidemia de Mendoza, sin saber aún que eran idénticas.

Se transformó la cepa *E. coli* LE392, que es sensible a todos los antibióticos en los cuales son capaces de crecer las cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* provenientes de la epidemia de Mendoza. Esta cepa de *E. coli* fue transformada con ADN de pMET1, utilizando para la selección antibióticos a los cuales las cepas de *K. pneumoniae* FC1 son resistentes. De esta manera se obtuvieron transformantes al emplear Ap o Ak, mientras que no crecían colonias al seleccionar con Tc, Cm o Gm (Tabla V). El mismo experimento se llevó a cabo empleando Sm para la selección de transformantes, y se obtuvieron colonias de bacterias resistentes a este AG, el cual no había sido incluido en el antibiograma (Tabla V). Por análisis del contenido plasmídico de las cepas de *E. coli* LE392 transformantes se determinó que contenían pMET1. Por lo tanto este plásmido es portador de genes capaces de conferir resistencia a Ap, Ak y Sm.

Tabla V. Resistencia a antibióticos conferida por pMET1.

cepas bacterianas	Antibióticos								
	Ap	Mz	Ak	Km	Tm	Gm	Sm	Cm	Tc
<i>E. coli</i> LE392									
<i>E. coli</i> LE392 (pMET1)	+	+	+	+	+		+		
<i>K. pneumoniae</i> FC1 (pMET1)	+	+	+	+	+		+	+	+

Se sembraron inóculos de las cepas bacterianas en medio de cultivo conteniendo cada uno de los antibióticos. Luego de incubar a 37°C durante períodos de hasta 48 horas, se observó la presencia o ausencia de colonias en cada caso. Para cada antibiótico se efectuaron cultivos de cepas conocidas, resistentes y sensibles como control.

Ap= ampicilina - Mz= mezlocilina - Ak= amikacina - Km= kanamicina - Tm= tobramicina - Gm= gentamicina - Sm= estreptomycinina - Cm= cloranfenicol - Tc= tetraciclina

+: se obtiene crecimiento en presencia de este antibiótico.

-: no se obtiene crecimiento en presencia de este antibiótico.

Las cepas de *E. coli* LE392 (pMET1) obtenidas al utilizar Ap para seleccionar transformantes se transfirieron a medios de cultivo que contenían otros antibióticos. Este experimento permitió analizar el espectro de resistencia cubierto por pMET1. Los resultados (Tabla V) indican que pMET1 contiene genes responsables de conferir resistencia a Ap, Ak, Km, mezlocilina, Sm y Tm, y que no confiere resistencia a Cm, Gm o Tc. Por lo tanto la cepa de *K. pneumoniae* FC1 multirresistente recibida debe llevar genes capaces de conferir resistencia a Cm y a

Te en su cromosoma; aunque no se puede descartar que estas resistencias estén codificadas en algún plásmido de gran tamaño, que no se detecte por los métodos empleados. En cambio, las resistencias a Ap, Ak, mezlocilina, Sm y Tm se deberían a la presencia en *K. pneumoniae* del plásmido pMET1.

Los mecanismos de resistencia a AGs presentes en bacterias se basan en: cambio en el rARN que produzca ribosomas a los que no se pueden unir los aminoglicósidos; alteraciones en la captación de los aminoglicósidos; o modificación del AB por acción enzimática (51). No se conocen casos de resistencia a AGs mediada por plásmidos basada en ninguno de los dos primeros mecanismos. Además es conocido que el último mecanismo mencionado es el de mayor importancia en clínica. Por lo tanto pMET1 muy probablemente codifica para alguna enzima modificadora de aminoglicósidos (26).

Varias enzimas involucradas en inactivación de este tipo de ABs han sido caracterizadas, analizando los productos de su acción. En base a este análisis muchas se caracterizaron por analogía del patrón de resistencia que confieren. Dentro del grupo de acetiltransferasas, la enzima 6'-N-acetiltransferasa (AAC(6')) media resistencia a Ak, Km, y Tm (51, 62, 104); siendo la que más se ajusta al patrón de resistencia conferido por pMET1. Esta enzima no confiere resistencia a Gm, a pesar que es capaz de modificarla; ni tampoco a Sm. Por lo tanto, la resistencia conferida por pMET1 a Sm se debería a la presencia de otro gen.

Simultáneamente con los experimentos de transformación se efectuaron conjugaciones entre las cepas de *K. pneumoniae* FC1 y *E. coli* SS320 (patrón de resistencias en Tabla VI). La finalidad era detectar la presencia de algún plásmido conjugativo o movilizable responsable de conferir resistencia a ABs.

Las conjugaciones entre *K. pneumoniae* y *E. coli* SS320 se llevaron a cabo en medio sólido, durante 15 horas. Pasado ese tiempo se seleccionaron transconjugantes empleando medio de cultivo conteniendo Nal para *E. coli* SS320 y Ak o Ap para el plásmido buscado. Se obtuvieron cepas transconjugantes, a partir de las cuales se preparó ADN plasmídico, el cual fue digerido con distintas enzimas de restricción y luego sometido a electroforesis en gel de agarosa. De esta forma se obtuvieron perfiles de restricción idénticos a los de pMET1, indicando que éste es un plásmido conjugativo. Para descartar la posibilidad de que pMET1 haya sido movilizado por un plásmido no detectado en la *K. pneumoniae* original se efectuó una conjugación entre *E. coli* HB101 (pMET1), obtenida por transformación de la bacteria con una preparación del plásmido proveniente de *K. pneumoniae*, y *E. coli* C2110. *E. coli* HB101 es sensible a Nal e incapaz de utilizar lactosa cuando se la cultiva en un medio que la contenga (Tabla VI). En base a estos datos se utilizaron Nal y Ak para la selección de transconjugantes. Las colonias obtenidas confirmaron ser *E. coli* C2110 al cultivarlas en medio diferencial BTB, ya que viraban el indicador que contiene a color amarillo, indicando acidificación del medio por fermentación de lactosa. Análisis de la presencia de ADN plasmídico demostró que contenían pMET1. Siguiendo el camino inverso, se obtuvo *E. coli* HB101 (pMET1) por conjugación entre *E. coli* HB101 y *E. coli* C2110 (pMET1). Las transconjugantes se seleccionaron por deficiencia en la utilización de lactosa al cultivarlas en medio BTB conteniendo Ak, y comprobando su sensibilidad a Nal. El patrón de resistencia a antibióticos de las diferentes cepas obtenidas por conjugación (Tabla VI) confirmó que pMET1 confiere resistencia a Ap, Ak, Km, Sm y Tm.

Tabla VI. Patrones de resistencia de cepas empleadas en experimentos de conjugación.

cepas bacterianas	Antibióticos							
	Nal	Ak	Km	Tm	Ap	Sm	Az	lac
<i>E. coli</i> SS320	+						+	N
<i>E. coli</i> HB101						+		N
<i>E. coli</i> C2110	+							U
<i>E. coli</i> SS320 (pMET1)	+	+	+	+	+	+	+	N
<i>E. coli</i> HB101 (pMET1)		+	+	+	+	+		N
<i>E. coli</i> C2110 (pMET1)	+	+	+	+	+	+		U

Se sembraron inóculos de las cepas bacterianas en medio de cultivo conteniendo cada uno de los antibióticos, y en medio diferencial BTB, que permite distinguir aquellas cepas que consumen lactosa de las que no lo hacen, debido a cambio de color por viraje del indicador que contiene. Luego de incubar a 37°C durante 24 horas, se observó la presencia o ausencia de colonias en cada caso de medio de cultivo conteniendo AB, o el viraje o no del indicador en BTB. Para cada AB se efectuaron cultivos de cepas conocidas, resistentes y sensibles como control. De la misma manera se cultivaron cepas que utilizan o no lactosa como fuente de carbono, a modo de control. En los experimentos de conjugación efectuados se utilizó Nal^r para seleccionar *E. coli* SS320; Nal^r o viraje del indicador del medio BTB a amarillo para *E. coli* C2110; Nal^s o estabilidad del color del medio BTB para *E. coli* HB101.

Nal = ácido nalidíxico, Ak = amikacina, Km = kanamicina, Tm = tobramicina, Sm = estreptomina, Az. = azida sódica, lac = lactosa.

+: se obtiene crecimiento en presencia de este antibiótico

-: no se obtiene crecimiento en presencia de este antibiótico

U: utiliza lactosa como fuente de C

N: no utiliza lactosa como fuente de C

La mayoría de los plásmidos conjugativos aislados de la naturaleza se encuentran reprimidos con respecto a la expresión del fenotipo donador, de forma tal que en un momento dado solo una de cada 1.000 a 10.000 células portadoras del mismo son capaces de transferirlo. Sin embargo, se han aislado plásmidos derreprimidos, para los cuales esencialmente todas las células que lo contienen son capaces de actuar como donadoras (40). La frecuencia de transferencia de pMET1 por conjugación se determinó de acuerdo al método descrito por Curtis (40). Se denomina frecuencia de conjugación a la relación entre el título de células transconjugantes obtenidas y el título de células dadoras de plásmido del que se partió, cuando la transferencia se lleva a cabo en condiciones de exceso de células recipientes con respecto a las dadoras.

$$\text{frec. de conjugación} = \frac{\text{tít. de céls. transconjugantes}}{\text{tít. de céls. donoras}}$$

Para determinar la frecuencia de conjugación de pMET1 se efectuaron conjugaciones entre *E. coli* HB101 (pMET1) y *E. coli* C2110 a 37^o, empleando una proporción 1 a 10 de la primera respecto a la última. De forma que para este caso:

$$\text{frec. de conjugación de pMET1} = \frac{\text{tít.de } E. coli \text{ C2110 (pMET1) obtenidas}}{\text{tít.de } E. coli \text{ HB101 (pMET1) donoras}}$$

Dados los patrones de resistencia de las cepas utilizadas (Tabla VI), la selección de transconjugantes se realizó en medio de cultivo conteniendo Nal y Ak. Además de seleccionar para *E. coli* C2110 el ác. nalidíxico inhibe posterior transferencia de ADN por conjugación; evitando que se obtengan títulos falsamente altos de transconjugantes para las condiciones empleadas, por continuación de la transferencia en el medio selectivo (40). Los títulos de células dadoras de plásmido y de transconjugantes se determinaron por suspensión de una cantidad de células donoras igual a la empleada en la conjugación y de mezcla de conjugación respectivamente, en medio de cultivo, y posterior siembra de diluciones adecuadas de esas suspensiones en medio conteniendo Ak para *E. coli* HB101 (pMET1), y Nal-Ak para *E. coli* C2110 (pMET1).

En una primera experiencia se permitió a la conjugación transcurrir durante siete horas, obteniéndose los valores que se muestran en la Tabla VII. La frecuencia de conjugación de 10 correspondiente a estas condiciones es muy superior al valor de 10⁻³ a 10⁻⁴ esperado para un plásmido reprimido para su conjugación; indicando que pMET1 se encuentra derreprimido para su transferencia. Sin embargo, los plásmidos conjugativos reprimidos para su conjugación suelen sufrir derrepresiones transitorias que permiten obtener frecuencias de conjugación mayores a las esperadas para su estado reprimido, si la conjugación ocurre durante un tiempo suficientemente prolongado (40). Para descartar esto último se disminuyó el tiempo de conjugación entre *E. coli* HB101 (pMET1) y *E. coli* C2110 a tres horas, la frecuencia de conjugación fue nuevamente 10 (Tabla VII). Esto descarta la posibilidad de una derrepresión transitoria, y demuestra que pMET1 es un plásmido conjugativo, que se encuentra derreprimido para su transferencia por este mecanismo.

Tabla VII. Frecuencia de conjugación de pMET1.

tiempo de conjug. (horas)	A=título de céls. Ak ^r de partida	B=título de céls. Nal ^r -Ak ^r obtenido	frecuencia de conjug. (B/A)
7	12,3 x 10 ⁹ /ml	11,2 x 10 ¹⁰ /ml	10
3	18,5 x 10 ⁹ /ml	16,8 x 10 ¹⁰ /ml	10

Se efectuaron conjugaciones entre *E. coli* C2110 y *E. coli* HB101 (pMET1) a 37°C durante distintos tiempos. El título de *E. coli* HB101 (pMET1) se determinó por recuento de colonias formadas a partir de la siembra de una suspensión de dicha cepa en medio de cultivo conteniendo Ak. El título de transconjugantes, *E. coli* C2110 (pMET1), se determinó por recuento de las colonias formadas a partir de una suspensión del producto de la conjugación, sembrado en medio de cultivo conteniendo Nal y Ak. La frecuencia de conjugación resulta de la relación entre ambos títulos.

IV-4. Resistencia a amikacina.

Dado nuestro particular interés por resistencia a Ak, se buscó determinar la existencia o no de alguna relación entre el gen responsable de resistencia a este AB presente en pMET1 y otros genes conocidos, determinantes de Ak^r. pMET1 confiere resistencia a los mismos aminoglicósidos que pJHCMW1. Se decidió comparar pMET1 con este plásmido, proveniente de una cepa aislada de un neonato enfermo de meningitis en el Hospital de Niños de Buenos Aires. pJHCMW1 es portador de genes que confieren resistencia a Ap, Ak, Km y Tm (193). Se había determinado que en este plásmido el gen responsable de resistencia a AGs se halla contenido en un fragmento de 3 kpb de pJHCMW1 flanqueado por sitios de restricción para la enzima **Bam**HI (177). Para compararlos, se efectuó una electroforesis en gel de agarosa de pMET1 sin tratar (Fig. 13-A) y digerido con diferentes enzimas de restricción (Fig. 13-A). Luego de transferencia a papel de nitrocelulosa se hibridaron los fragmentos presentes en este gel. La sonda empleada consistió en el mencionado fragmento de 3 kpb producido por digestión de pJHCMW1 con **Bam**HI, marcado radioactivamente (Fig. 13-B), que contiene el gen responsable de Ak^r (177).

Se observa hibridación entre pMET1 (entero o alguno/s de sus fragmentos, producto de digestión) y la sonda portadora de las determinantes genéticas para resistencia a Ak, Km y Tm en pJHCMW1. Es decir que existe homología entre la región de pJHCMW1 que codifica estas resistencias y pMET1. En la línea 3 de la figura 13-B vemos que por digestión de pMET1 con **Bam**HI se produce un único fragmento que hibrida con la sonda usada. Este fragmento presenta un tamaño de 3 kpb. Existe por lo tanto homología entre la zona de pJHCMW1, responsable de conferir resistencia a Ak, y una región de igual tamaño, comprendida entre los mismos sitios de restricción (**Bam**HI), en pMET1. En pJHCMW1 esta zona codifica una acetiltransferasa que inactiva Ak, Km y Tm.

Dado que por digestión de pMET1 con **Bam**HI se obtenía un único fragmento que hibridaba con la sonda que contiene el gen responsable de resistencia a AGs (Fig. 13-B), se intentó clonar el gen que confiere resistencia a Ak en pMET1 empleando dicha endonucleasa. El vector elegido fue pBR325, que contiene un único sitio para **Bam**HI. El clonado se efectuó por digestión de pMET1 y pBR325 con la enzima **Bam**HI y posterior ligación de los fragmentos de ADN obtenidos utilizando T4 DNA ligasa. Los productos de este tratamiento fueron empleados para transformar *E. coli* HB101. Las transformantes se seleccionaron por resistencia a Cm para el vector y a Ak para el inserto (Fig. 14). Preparaciones de ADN de plásmido de las células transformantes fueron digeridas con **Bam**HI y los productos, sometidos a electroforesis en gel de agarosa. Por comparación con los fragmentos que se obtienen por acción de esta misma endonucleasa sobre pBR325 y pMET1 (Fig. 15) se verificó que se había construido un plásmido, pROX1, que consta de pBR325 con un inserto de 3 kpb, proveniente de pMET1, en su sitio **Bam**HI. *E. coli* HB101 (pROX1) es capaz de crecer en medios de cultivo que contienen Ak, así como también Km, Sm y Tm (Tabla VIII). Dado que pBR325 no confiere resistencia a AGs y pROX1 sí es capaz de hacerlo, el fragmento responsable de esta característica debe ser el inserto proveniente de pMET1. Es decir que las determinantes genéticas para resistencia a Ak, Km y Tm en pMET1 se encuentran dentro de este fragmento de 3 kpb.

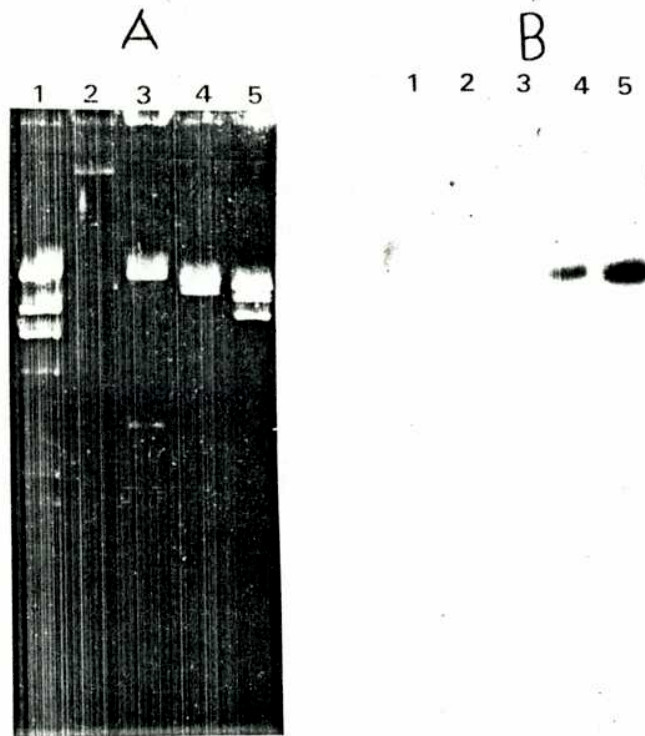


Figura 13. Hibridación de pMET1 con secuencias de pJHCMW1 que contienen los genes para resistencia a aminoglicósidos. **A-** EGA de pMET1 sin digerir (línea 2), y digerido con: línea 3, **Bam**HI; línea 4, **Eco**RI; línea 5, **Hind**III. La línea 1 es fago digerido con **Hind**III, empleado como marcador de tamaño. **B-** Autorradiografía de hibridación del gel A, luego de transferido a papel de nitrocelulosa, con el fragmento de 3kbp formado por digestión de pJHCMW1 con **Bam**HI, marcado con ^{32}P .

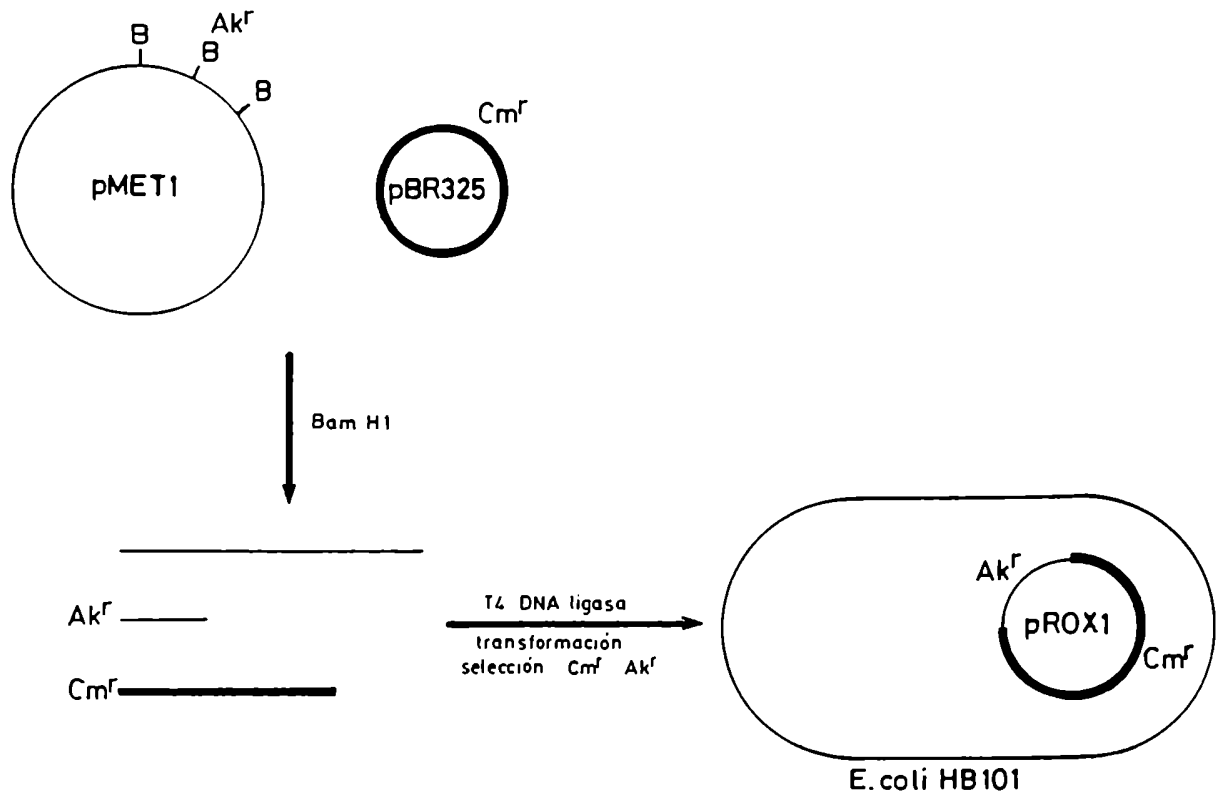


Figura 14. Construcción de pROX1. pMET1 y pBR325 fueron digeridos con **Bam**HI, los fragmentos obtenidos ligados mediante T4 DNA ligasa, y el producto empleado para transformar *E. coli* HB101, seleccionando por resistencia a Cm (para pBR325) y a Ak (para el inserto).

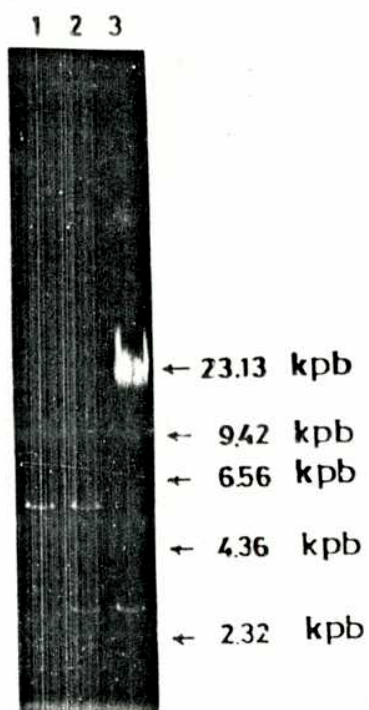


Figura 15. Estructura de pROX1. EGA de los productos de digestión con **Bam**HI de: línea 1, pBR325; línea 2, pROX1; línea 3, pMET1. Se indica el tamaño de algunos fragmentos de fago λ digerido con **Hind**III, que se usó como marcador de tamaño.

Tabla VIII. Patrón de resistencia a antibióticos conferido por un fragmento de 3 kpb de pMET1.

cepas bacterianas	Cm	Ak	Tm	Km	Sm	Tc
<i>E. coli</i> LE392	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> LE392 (pBR325)	+	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i> LE392 (pROX1)	+	+	+	+	+	-

Se sembraron inóculos de las distintas cepas en consideración en medio de cultivo conteniendo los antibióticos mencionados, al cabo de 15 horas a 37°C se observó la presencia (+) o ausencia (-) de colonias en cada caso.

El mapa físico del fragmento de pMET1 presente en pROX1 (Fig. 16) se determinó mediante digestiones simples, dobles y triples del mismo con distintas enzimas de restricción, electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos y determinación de su tamaño por comparación con segmentos de ADN standard (los productos de algunos de estos tratamientos pueden verse en la Fig. 17). Este mapa resultó idéntico al del fragmento de pJHCMW1 presente en pJHCT00181 (Fig. 16). Este último plásmido está compuesto por pBR325 con un inserto en su sitio **Bam**HI correspondiente al fragmento **Bam**HI de 3 kpb de pJHCMW1, el cual es portador de los genes responsables de resistencia a Ak, Km, Sm y Tm (176). La figura 17 muestra la identidad entre pJHCT00181 y pROX1, en cuanto a los fragmentos obtenidos por tratamiento de ellos con cada una de las endonucleasas utilizadas. En todos los casos se utilizó **Bam**II, además de la otra enzima, para separar el vector (fragmento de mayor tamaño obtenido) del inserto. En los carriles 3 a 8 de la figura vemos siempre un fragmento de 6 kpb correspondiente a pBR325 que fue separado del inserto por acción de **Bam**III. Los fragmentos más pequeños provienen de corte del inserto por la enzima correspondiente. Al igual que el fragmento de pJHCMW1, contenido en pJHCT00181, la porción comparada de pMET1 no contiene sitios de corte para **Cla**I, **Eco**RI, **Eco**RV, **Pst**I o **Hind**III. Los fragmentos de 3 kpb flanqueados por sitios **Bam**HI en pMET1 y pJHCMW1 presentan el mismo mapa físico, son homólogos y son portadores de resistencia a los mismos antibióticos. Por lo tanto estos fragmentos provenientes de ambos plásmidos resultan idénticos por los tres criterios empleados.

En estudios previos (176), a partir de pJHCT00181 se obtuvieron mutantes por delección, acotando la localización del gen responsable de resistencia a Ak a 1,5 kpb; y mutantes por inserción de fragmentos de ADN en distintos sitios. Algunas de las inserciones suprimen la capacidad de conferir resistencia a Sm, sin alterar la resistencia a AK, Km y Tm. A la inversa inserciones que inactivan la resistencia a Ak, Km y Tm no afectan la resistencia a Sm. Estos datos, junto con las características de AAC(6'), que confiere resistencia a AK, Km y Tm, pero no a Sm (62), indican que existen dos enzimas codificadas por ese fragmento de 3 kpb de **Bam**HI presente en pJHCMW1. Mientras se realizaba este trabajo se obtuvieron resultados por secuenciación de un fragmento de pJHCMW1 (130), que permiten deducir la existencia de esas dos enzimas. La secuencia del gen de resistencia a Ak presente en pJHCMW1 (130) corresponde a la del gen *aacA4* (180), que codifica la acetiltransferasa AAC(6')-4, inactivadora de Ak. A continuación del gen *aac* se encuentra un gen *aadA*, codificador de aminoglicósido 3",9-adeniltransferasa, esta

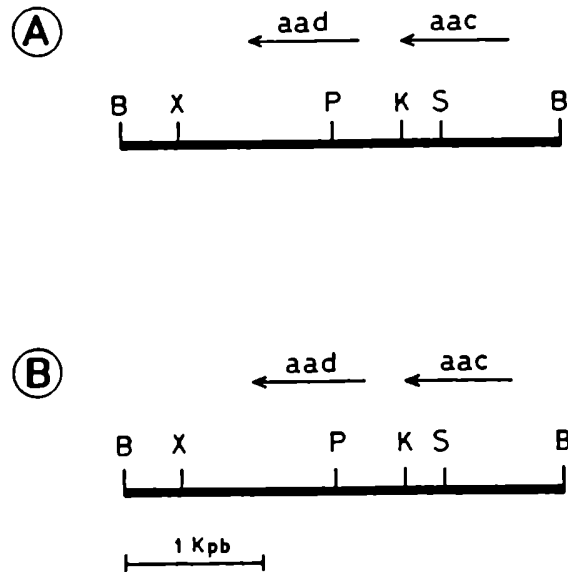


Figura 16. Mapa físico y genético de fragmentos clonados a partir de pMET1 y pJHCMW1 que confieren resistencia a AK. Mapa físico de fragmentos de 3 kbp obtenidos por acción de BamHI a partir de: A-pMET1 y B-pJHCMW1. Estos fragmentos confieren resistencia a Ak, Km, Sm y Tm. Los mapas de restricción se obtuvieron por digestión de pROX1 y pJHCT00181, que son clones de los fragmentos mencionados en pBR325.

B = BamHI; K = KpnI; P = PvuI; S = SstI; X = XhoI

Las flechas indican las localizaciones acotadas para los genes que confieren resistencia a Ak-Km-Tm y a Sm.

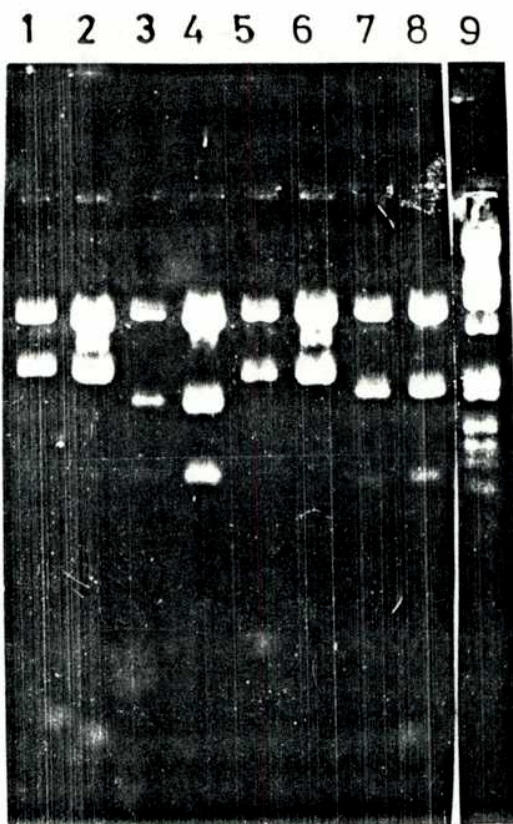


Figura 17. Comparación de pJHCT00181 con pROX1 por digestión con enzimas de restricción. EGA de productos de digestión de pJHCT00181 (carriles 1, 3, 5, 7) y pROX1 (carriles 2, 4, 6, 8) con : carriles 1 y 2, **Bam**HI; carriles 3 y 4, **Bam**HI y **Kpn**I; carriles 5 y 6, **Bam**HI y **Xho**I; carriles 7 y 8, **Bam**HI y **Sst**I. El carril 9 es λ -**Hind**III y ϕ X174 digerido con **Hae**III, cuyos fragmentos observados miden 23,23; 9,42; 6,56; 4,36; 2,32; 2,03; 0,56 kpb; y 1,353; 1,078; 0,872 y 0,603 kpb, respectivamente.

enzima es capaz de inactivar Sm. Estos estudios confirman la existencia en pJHICMW1 de dos genes que codifican para dos enzimas, una AAC(6') que confiere resistencia a Ak, Km y Tm; y una adeniltransferasa, responsable de la resistencia a Sm.

Dada la identidad encontrada por tres criterios entre el fragmento de pJHICMW1 que presenta las características descritas y una porción de ADN de pMET1; se deduce que se trata del mismo segmento de ADN, presente en dos plásmidos no relacionados (ver sección IV-7.3) y aislados de diferentes localizaciones. En este caso los estudios realizados para pJHICMW1, con respecto a su resistencia a Ak, Km, Sm y Tm serían también válidos para pMET1.

IV-5. Enzima inactivadora de aminoglicósidos.

Para confirmar bioquímicamente que la actividad enzimática responsable de la inactivación de Ak codificada por pMET1 es efectivamente una acetiltransferasa, se prepararon extractos de *E. coli* HB101 (pMET1). Preparaciones obtenidas por sonicación, por ruptura celular con French-press o por shock osmótico (SO) se ensayaron para actividad de AAC, APH y AAD. Cualquiera fuera la forma en que se preparaba el extracto se obtenía actividad de AAC al usar como sustrato Ak, Km o Tm (Fig. 18-C). Esta actividad se determinó por el método del papel de fosfocelulosa (78) modificado como se explica en Materiales y Métodos. Las cantidades de aminoglicósido acetilado obtenido en cada caso se indican en la Tabla IX. Como testigos se emplearon extractos celulares preparados por el mismo método a partir de *E. coli* HB101 (testigo negativo) (Fig. 18-B) y *E. coli* HB101 (pMB8::Tn1700) (testigo positivo) (Fig. 18-D). pMB8::Tn1700 es un plásmido que codifica para una AAC (153) capaz de inactivar Km.

Tabla IX. Producción de aminoglicósido acetilado.

cepa bacteriana	sustrato	producto acetilado (cpm de ^{14}C)	acetilCoA remanente (cpm de ^{14}C)
blanco	Ak	30	8.000
<i>E. coli</i> HB101	Ak	30	8.050
<i>E. coli</i> HB101(pMET1)	Ak	4.700	3.200
<i>E. coli</i> HB101(pMB8::Tn1700)	Km	5.250	2.640

En un contador de centelleo se midió la radioactividad contenida en el origen (aminoglicósido acetilado) y en el frente de corrida (acetil CoA) de las corridas cromatográficas de la Fig. 18.

Se ensayó fosfotransferasa según el método del papel de fosfocelulosa (78) modificado. No se pudo detectar esta actividad usando como sustrato Ak, Gm, Km o Tm (Fig. 19-C). En cambio se obtenía AG fosforilado para un extracto de *E. coli* HB101 (pRK231) (Fig. 19-D), utilizado como testigo positivo, al emplear Km

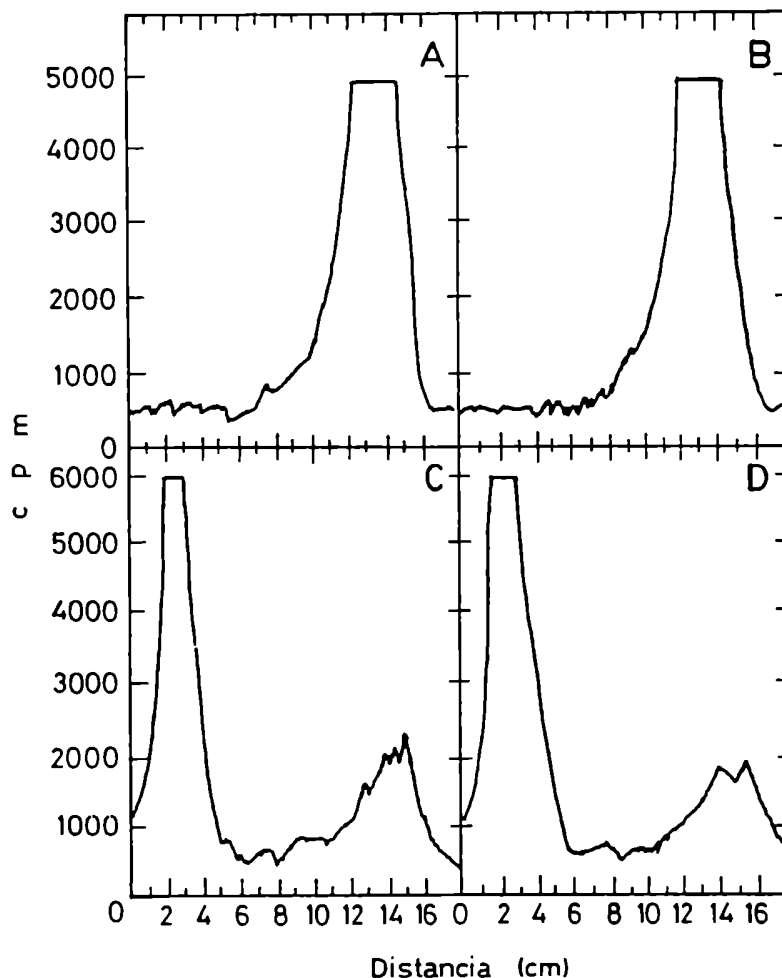


Figura 18. Actividad de AAC. Se prepararon extractos por SO a partir de distintas cepas. Se determinó la actividad de AAC contenida en esos extractos por el método del papel de fosfoCelulosa (78) modificado. Los productos de la reacción enzimática, marcados radioactivamente, se separaron del sustrato (^{14}C)acetil CoA por cromatografía en papel de fosfoCelulosa. A- blanco utilizando buffer en lugar de extracto; B- extracto de *E. coli* HB101 (sustrato Ak); C- extracto de *E. coli* HB101 (pMET1) (sustrato Ak); D- extracto de *E. coli* HB101 (pMB8::Tn1700) (sustrato Km). Si se emplea Km o Tm como sustrato en el caso C, el resultado es idéntico.

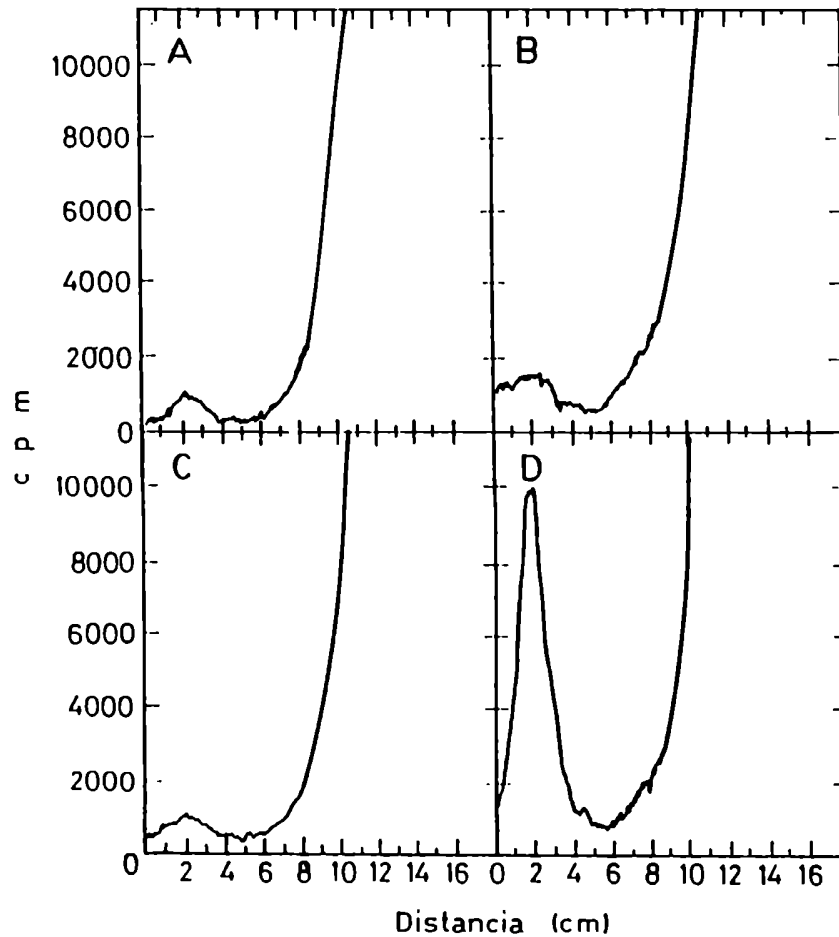


Figura 19. Actividad de fosfotransferasa. Se prepararon extractos por SO a partir de distintas cepas. Se determinó la actividad de fosfotransferasa contenida en esos extractos por el método del papel de fosfocelulosa (78) modificado. Los productos de la reacción enzimática, marcados radioactivamente, se separaron del sustrato (^{32}P) γ -ATP por cromatografía en papel de fosfocelulosa. **A-** blanco utilizando buffer en lugar de extracto; **B-** extracto de *E. coli* IIB101 (sustrato Ak); **C-** extracto de *E. coli* IIB101 (pMEF1) (sustrato Ak); **D-** extracto de *E. coli* IIB101 (pRK231) (sustrato Km). Si se emplea Km o Tm como sustrato en el caso C, el resultado es idéntico.

como sustrato (Fig. 19-C). Por el mismo método se buscó actividad de adeniltransferasa, empleando como testigo positivo extracto obtenido por SO a partir de cultivos de *E. coli* HB101 (pH11313b), y como sustrato Gm. En este caso el resultado también fue negativo para *E. coli* HB101 (pMET1), al emplear Ak como sustrato.

La resistencia a Ak, Km y Tm conferida por pMET1 estaría entonces determinada por la acción de una AAC. La especificidad de esta enzima para distintos antibióticos concuerda con la de AAC(6') (62), proveyendo una buena explicación al espectro de resistencia otorgado por el plásmido. El plásmido pJHCMW1 también codifica para una AAC capaz de actuar sobre Ak, Km, Tm y Gm. Se inició entonces una purificación parcial de las acetiltransferasas codificadas por pMET1 y pJHCMW1, a fin de compararlas y establecer similitudes o diferencias entre ambas.

Existen diversos métodos que permiten obtener extractos de bacterias conteniendo AAC. La técnica de SO permite preparar soluciones que contienen solamente algunas de las proteínas de la bacteria, las cuales se definen como proteínas periplásmicas (78, 131). Por lo tanto contienen mucha menor cantidad y variedad de proteínas que los extractos celulares completos, preparados por cualquier técnica basada en ruptura celular. En el caso de *E. coli* HB101 (pMET1) se encontró que los extractos obtenidos por sonicación o ruptura por French-press contenían aproximadamente el doble de concentración de AAC que aquellos preparados por SO (Tabla X). Sin embargo por determinación de proteínas mediante el método de Lowry (105) se encuentra que la concentración de proteínas en el extracto preparado por ruptura celular es varias veces mayor a la que contiene el preparado por SO (Tabla X), de forma que la actividad específica es mayor en extractos preparados por SO. En base a estos datos (Tabla X) se decidió preparar los extractos por SO, a fin de aprovechar su mayor actividad específica.

Tabla X. Actividad específica de AAC en extractos de *E. coli* HB101 (pMET1).

extracto obtenido por	act. AAC cpm/30 μ l	cc prots. μ g/ml	act. específica cpm/ μ g prots.
SO	3.500	306	381
sonicación	7.120	2.440	97,2
French Press	7.050	2.220	105,8

Se prepararon extractos por SO, por sonicación y por ruptura con French Press a partir de cultivos de 15 horas de *E. coli* HB101 (pMET1). Alícuotas de estos extractos fueron empleadas para la determinación de actividad de AAC por el método del papel de fosfoceulosa (78) y la concentración de proteínas por el método de Lowry (105).

Extractos preparados por SO a partir de cultivos de *E. coli* HB101(pMET1) y *E. coli* HB101(pJHCMW1) fueron sometidos a cromatografía de intercambio iónico en un columna de DEAE-sephacel. La capacidad de una proteína de ser retenida en cromatografía de intercambio iónico a un determinado pH es función de las cargas que expone su estructura en esas condiciones. La fuerza iónica

requerida para disminuir las interacciones entre los grupos cargados de la resina y la proteína, a punto tal que esta eluya de la columna, también depende de las características de carga de la proteína. La actividad de AAC proveniente de *E. coli* HB101 (pMET1) era retenida por la columna de DEAE-sephacel, a pH 7.8. Al aplicar un gradiente de NaCl esta actividad eluía para una concentración 0,2 M de la sal (Fig. 20). La actividad de AAC contenida en extractos de *E. coli* HB101(pJHCMW1) mostró las mismas características, siendo los patrones de elución idénticos en ambos casos (Fig. 20). Esto indica una similitud entre ambas proteínas, que concuerda con la identidad entre los fragmentos de ADN que las codifican.

Al determinar la actividad de AAC utilizando distintos AGs como sustrato, el pico de actividad enzimática eluye para la misma fuerza iónica. Esto indicaría que nos hallamos ante una única enzima capaz de inactivar Ak, Km y Tm, o bien ante distintas proteínas con características de carga y actividades catalíticas muy similares. Teniendo en cuenta los datos obtenidos por secuenciación de zonas de pJHCMW1 (130) se deduce que la primera opción mencionada es la correcta. Estos datos (130) demuestran también que el gen *aac* se halla fusionado a las señales de iniciación de transcripción y traducción de β -lactamasa, y que comparte los primeros seis aminoácidos con esta enzima (130). Debido a que β -lactamasa se expresa en forma constitutiva, es probable que la expresión de AAC también lo sea.

A fin de detectar actividades enzimáticas del mismo orden en los casos de pMET1 y pJHCMW1 fue necesario utilizar tres veces mayor cantidad de proteína contenida en extracto preparado por SO a partir de *E. coli* HB101 (pMET1) que a partir de *E. coli* HB101 (pJHCMW1). La comparación entre actividades específicas para AAC en ambas preparaciones (Tabla XI), muestra que es mucho mayor en el caso de pJHCMW1 que en el de pMET1. pJHCMW1 se encuentra en alto número de copias en las células, mientras que pMET1 presenta bajo número de copias. Resulta natural entonces que por efecto de dosis génica la cantidad de enzima producida sea mayor en bacterias portadoras de pJHCMW1. Esta consideración está de acuerdo con la expresión constitutiva del gen que codifica para AAC.

Tabla XI. Actividad específica de AAC en extractos preparados por SO.

cepa utilizada	Act.AAC cpm/30 μ l	cc.prots. μ g/ml	Act. específica cpm/ μ g prots.
<i>E. coli</i> HB101	---	315	---
<i>E. coli</i> HB101 (pMET1)	3.500	306	381
<i>E. coli</i> HB101 (pJHCMW1)	10.260	300	1.140

Se prepararon extractos por SO a partir de cultivos en medio conteniendo 25 μ g/ml de Ak de cada cepa. Se determinó concentración de proteínas por el método de Lowry (105) y actividad AAC por el método del papel de fosfocelulosa (78), usando Ak como sustrato, en alícuotas de las preparaciones.

Las fracciones eluidas de la columna de intercambio aniónico al cromatografiar preparaciones por SO de cultivos de *E. coli* HB101 (pMET1) y *E. coli* HB101 (pJHCMW1), que contenían actividad de AAC, se reunieron en un "pool"

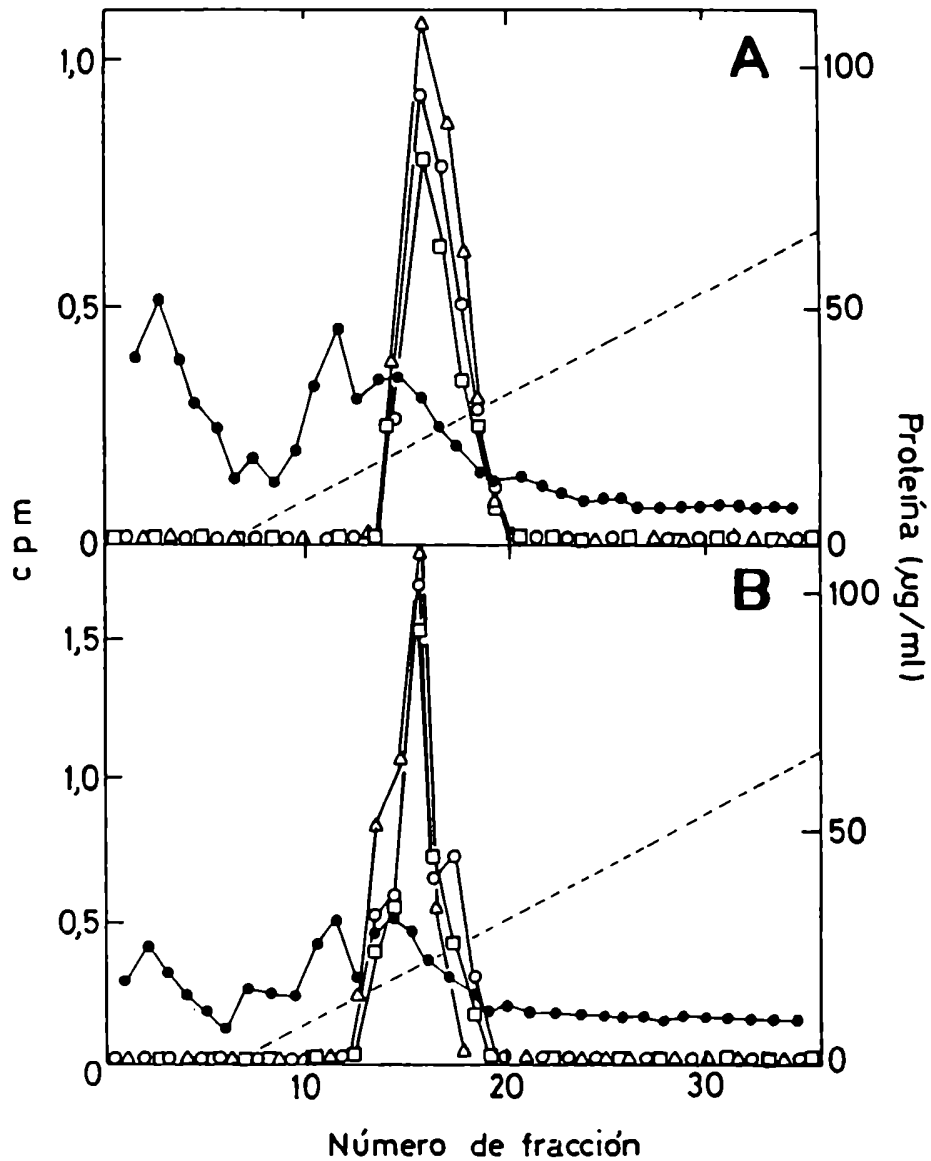


Figura 20. Cromatografía en DEAE-Sephacel de extractos de *E. coli* HB101 conteniendo pMET1 y pJHCMW1. Preparaciones por shock osmótico de extractos de *E. coli* HB101 conteniendo pMET1 (A) o pJHCMW1 (B) se sembraron en una columna de DEAE-Sephacel y se eluyeron con un gradiente 0-0,6 M de NaCl equilibrado con buffer (línea quebrada). Las fracciones recogidas fueron de 1 ml. La actividad enzimática se determinó usando como sustrato Ak (o), Tm (Δ) y Km (x). Las proteínas (●) se determinaron por el método de Lowry (105).

para cada caso. Estos fueron empleados en un paso posterior de purificación, consistente en una cromatografía de afinidad. Para ello se empleó una columna de CL-Sepharosa 4B unida a Ak preparada como se describe en Materiales y Métodos. Los "pool" provenientes de cromatografía en DEAE-sephacel debieron ser liberados de sales mediante diálisis, para evitar que la alta fuerza iónica interfiriera en la interacción AAC-Ak. Otra precaución consistió en sembrar las muestras dialisadas en una pequeña columna de CL-Sepharosa 4B y recoger la fracción no adsorbida en cada caso. Este paso elimina proteínas que se unen a este soporte y permite a su vez comprobar que este no es el caso para AAC, ya que ésta se encuentra en el eluido en cantidad similar a la sembrada. Cumplidos estos dos requisitos se sembró cada muestra en la columna de afinidad. Luego de reiterados lavados con buffer para eliminar las proteínas unidas no específicamente se procedió a la elución específica con una solución de buffer conteniendo 5 mg/ml de Ak. El aminoglicósido agregado compete con la Ak unida covalentemente al soporte por los sitios de unión específica a las moléculas de enzima, liberándolas de la columna. De esta forma se obtuvo un pico agudo de AAC, que exhibe el mismo perfil de elución para las muestras provenientes de *E. coli* HB101 (pMET1) y *E. coli* HB101 (pJHCMW1) (Fig. 21). Este experimento demostró que AAC parcialmente purificada, codificada en pMET1 y en pJHCMW1 se comporta de la misma manera con respecto a su afinidad por Ak.

La totalidad de la fracción eluida de columna de afinidad que contiene actividad enzimática en cada caso fue tratada con ácido tricloroacético, precipitando las proteínas que contenía. El precipitado fue resuspendido y sometido a PAGE-SDS. Por tinción con Coomassie Blue de las proteínas no se observaba ninguna banda para estas muestras. Si la tinción se realizaba con plata, en cambio, aparecían cuatro bandas, idénticas en los dos casos, de las cuales una correspondía a 26 kD.

Las proteínas AAC provenientes de *E. coli* HB101 (pMET1) y *E. coli* HB101 (pJHCMW1) copurifican, rindiendo al final de la purificación parcial bandas idénticas en PAGE-SDS. Presentan el mismo comportamiento con respecto a su afinidad por Ak y a las cargas que exponen cuando se encuentran bajo condiciones idénticas. Esta similitud encontrada entre ambas proteínas por criterios bioquímicos apoya la hipótesis de que se trata en realidad de la misma proteína, codificada por el mismo gen, presente en plásmidos distintos.

Finalmente, para confirmar que se trata de una acetiltransferasa que modifica la molécula en la posición 6', se determinó la actividad enzimática en extractos de *E. coli* HB101 (pMET1) y *E. coli* HB101 (pJHCMW1) preparados por SO, utilizando como sustrato un análogo de Ak, BBK311 (94). BBK311 difiere de Ak en que está sustituido en su posición 6'. Por lo tanto AAC(6') no es capaz de modificarlo, por no hallarse libre su sitio de acetilación. Los resultados obtenidos al determinar actividad AAC en extractos provenientes de *E. coli* HB101 (pMET1) y *E. coli* HB101 (pJHCMW1), usando BBK311 como sustrato (Fig. 22) indican que las enzimas codificadas por estos plásmidos no tienen capacidad de actuar sobre él. Esto demuestra que ambos plásmidos codifican para AACs idénticas que acetilan aminoglicósidos en su posición 6', es decir, codifican AAC(6').

IV-6. Identificación de AAC(6').

Se estudió la expresión *in vivo* e *in vitro* del gen que codifica AAC(6'). Debido a que los genes *aac* presentes en pMET1 y pJHCMW1 son idénticos (secciones IV-4. y IV-5.) los experimentos fueron realizados partiendo de un derivado de pJHCMW1. Dicho derivado, pJHCT15.2 (Fig. 23) se originó a partir de

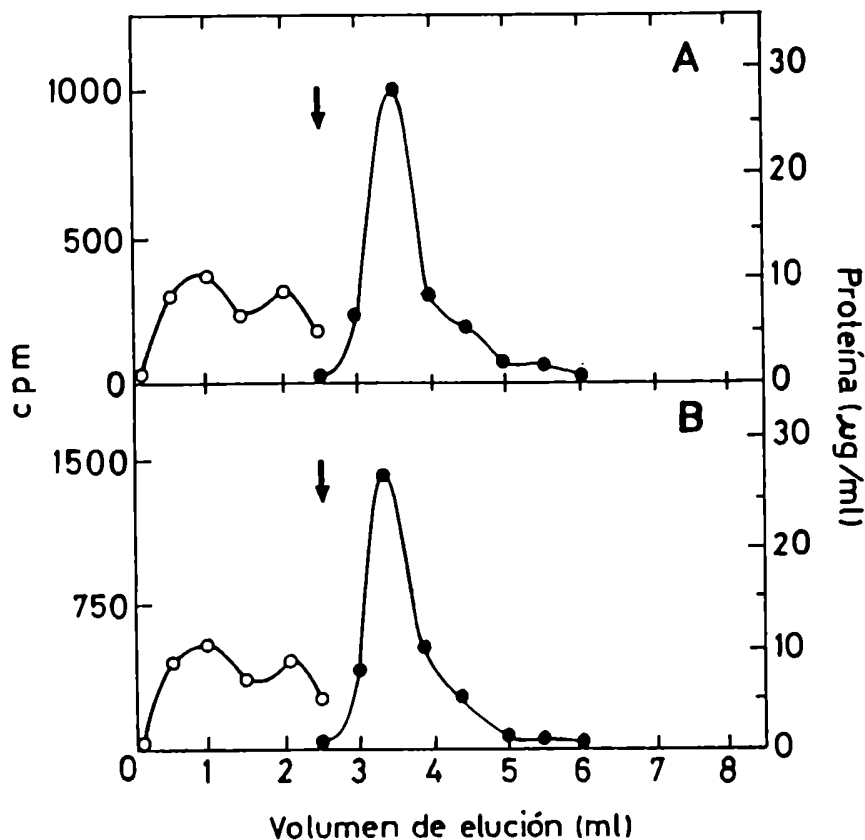


Figura 21. Cromatografía en CL-Sepharosa 4B-Ak. Las fracciones eluidas de DEAE-Sepharcel que contienen actividad AAC (ver leyenda Fig.20) se dializaron y sembraron en una columna de CL-Sepharosa 4B-Ak. Luego de lavado con buffer se procedió a la elución mediante una solución de Ak 5 mg/ml (la flecha indica el comienzo de la elución). Se determinó AAC por el método del papel de fosfocelulosa (78) en todas las fracciones; y concentración de proteínas por el método de Lowry (105) en las fracciones previas a la elución con Ak. No se determinó cc de proteínas en las fracciones eluidas posteriormente a la aplicación de Ak, ya que ésta interfiere con los métodos ensayados, y resulta difícil de extraer de las muestras. Las fracciones recogidas fueron de 0,5 ml. A- perfil correspondiente a la muestra proveniente de *E. coli* HB101 (pMET1); B- perfil correspondiente a la muestra proveniente de *E. coli* HB101 (pJHCMW1)

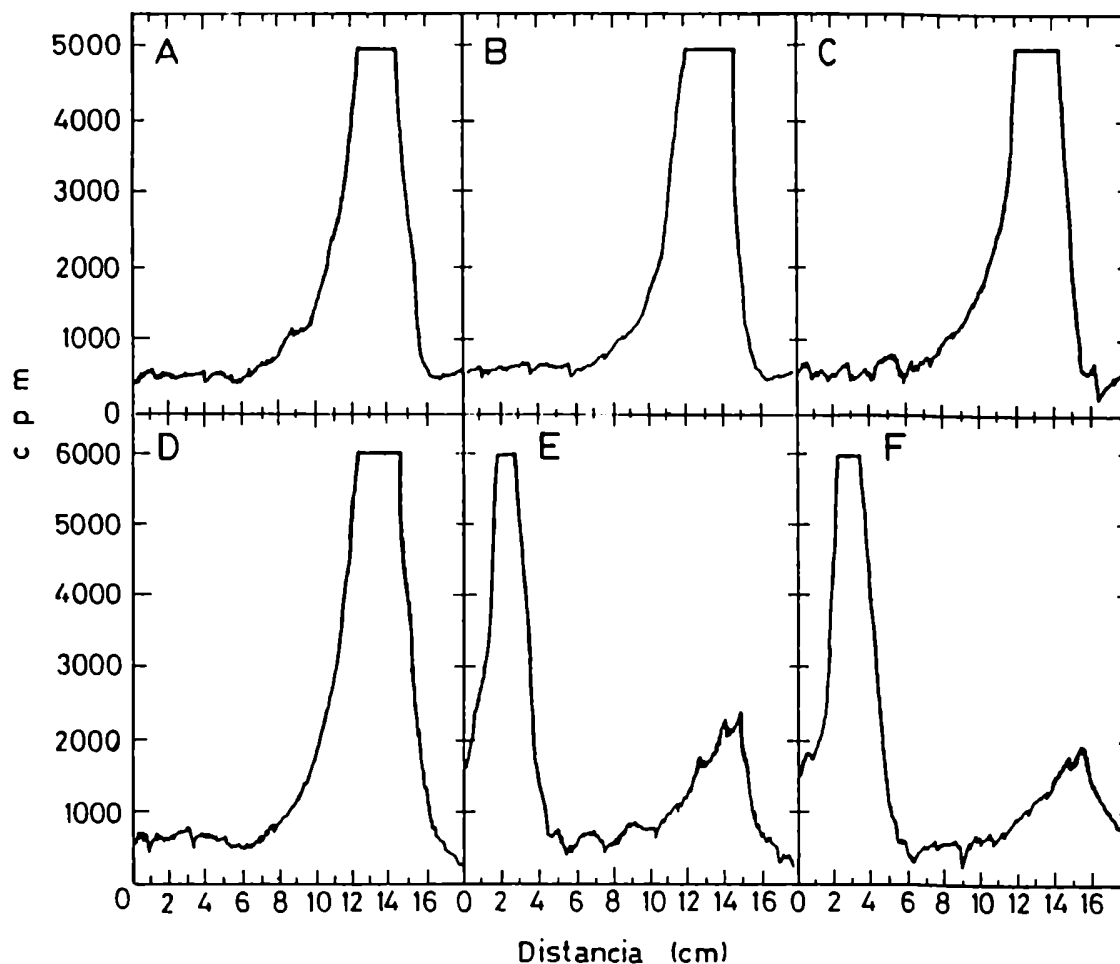


Figura 22. Actividad AAC utilizando BBK311 como sustrato. Se prepararon extractos por SO a partir de distintas cepas. Se determinó la actividad de acetiltransferasa contenida en esos extractos por el método del papel de fosfocelulosa (78) modificado como se explica en Materiales y Métodos, sección II-3.1. Los productos de la reacción enzimática, marcados radioactivamente, se separaron del sustrato (^{14}C)acetil CoA por cromatografía en papel de fosfocelulosa. A- blanco utilizando buffer en lugar de extracto; B- extracto de *E. coli* HB101; C- extracto de *E. coli* HB101 (pMET1); D- extracto de *E. coli* HB101 (pRK231). Los testigos positivos fueron: E- extracto de *E. coli* HB101 (pMET1) usando Ak como sustrato, y F- extracto de *E. coli* HB101 (pRK231) usando Kim como sustrato.

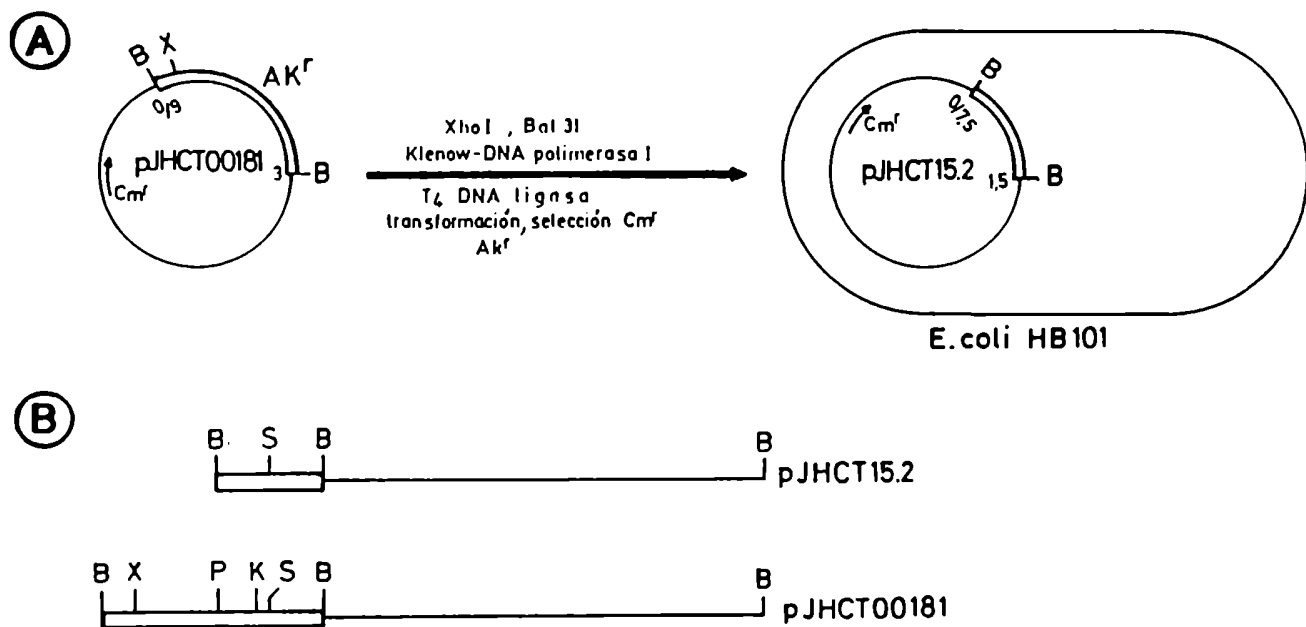


Figura 23. Construcción y mapa de restricción de pJHCT15.2. A- Diagrama de la construcción de pJHCT15.2 (177). El fragmento BamHI de 3 kbp proveniente de pJHCT00181 se clonó en el sitio BamHI de pBR325, generando pJHCT00181 ($Cm^r, Ap^r, Sm^r, Ak^r, Km^r, Tm^r$) (177). Este plásmido se linealizó con XhoI y se digirió con BamHI. Los extremos se llenaron por acción del fragmento mayor de DNA polimerasa I y se ligaron con T4 DNA ligasa. Los productos se introdujeron en *E. coli* HB101 por transformación, seleccionando por resistencia a Ak y a Cm. Una de las colonias obtenidas contenía el plásmido pJHCT15.2 (177), cuyo mapa físico se muestra en B. Este plásmido confiere resistencia a Ap, Ak, Km y Tm. B=BamHI; K=KpnI; P=PvuI; S=SstI; X=XhoI

pJHCT00181, por delección con exonucleasa *Bal31* de una porción de ADN que contiene la mayor parte del gen *aad*, responsable de Sm^r (177).

En una primera experiencia se realizaron experimentos de transcripción y traducción *in vitro*, usando como templados pJHCT15.2 y pBR325. Este último plásmido se empleó como testigo; ya que pJHCT15.2 está compuesto por pBR325 con un inserto de 1,5 kpb proveniente de pJHCTMW1 (Fig. 23-B).

Los productos de transcripción y traducción fueron sometidos a PAGE en condiciones desnaturalizantes y revelados por autorradiografía. La figura 24 muestra en la línea 1 los polipéptidos codificados por el vector pBR325. En la línea 2 vemos las proteínas producidas a partir de pJHCT15.2. Se indican las bandas correspondientes a β -lactamasa y a cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) cuyos pesos moleculares son conocidos. No se observan bandas diferentes de las obtenidas para pBR325, que pudieran corresponder a AAC(6'). La banda correspondiente a CAT codificada por pBR325, enmascararía la presencia de cualquier otra proteína de peso molecular cercano a 24,5 kD. De acuerdo al trabajo de secuenciación de Nobuta et al (130) el peso molecular esperado para AAC(6') es muy próximo al de CAT, por lo tanto ésta debía ser eliminada para poder identificar AAC(6'). Con ese fin se generó pMET2.0. Este plásmido proviene de pJHCT15.2, por digestión doble con *EcoRI* y *EcoRV*, y tratamiento de los productos obtenidos con el fragmento mayor de DNA polimerasa I seguido de ligación con T4-DNA ligasa (Fig. 25). pMET2.0 carece del gen *cat*, que codifica CAT. Su utilización elimina la interferencia introducida por esta enzima en la interpretación de los resultados obtenidos con pJHCT15.2.

Por transcripción y traducción *in vitro* de pMET2.0 se produce un polipéptido de movilidad correspondiente a 26 kD, que no se forma a partir de pBR325 (Fig. 26). Esta proteína podría estar presente en el caso de pJHCT15.2, y su visualización haber sido enmascarada por CAT. Probablemente esta proteína de 26 kD sea AAC(6'). Para confirmarlo se originó un nuevo plásmido, pMET2.1, diseñado para producir una AAC(6') truncada, que permitiera distinguir claramente el producto del gen *aac*, debido a su sustitución por una proteína de menor tamaño. pMET2.1 se generó por digestión de pJHCT00181 con *BstEII* y religación para formar pJHCT3.1. Este último plásmido fue sometido a la acción de *EcoRI* y *EcoRV*, tratamiento con el fragmento Klenow de DNA polimerasa I y posterior ligación, originando el plásmido pMET2.1 (Fig. 27). Este tratamiento, al igual que en el caso de pJHCT15.2, eliminó el gen *cat*, evitando su interferencia. Por transcripción y traducción de pMET2.1 se produjo un polipéptido de peso molecular 16,5 kD, mientras que no aparece la banda correspondiente a 26 kD que originaba pMET2.0 (Fig. 26). Los valores de peso molecular esperados para AAC(6') y su derivado truncado de acuerdo a la secuencia que los codifica (130) eran de 26 y 16,5 kD, respectivamente, estos datos indican que la proteína de 26 kD debe ser AAC(6').

Sin embargo, como producto de pMET2.0 aparece otro polipéptido, de 19 kD (Fig. 26, carril 3). Este correspondería a otro marco de lectura abierto presente en el mismo fragmento de ADN (130). Por transcripción y traducción *in vitro* de pMET2.1 aparece un polipéptido de 12,5 kD (Fig. 26, línea 4) que podría corresponder al polipéptido de 19 kD truncado. No podemos determinar entonces, en base a estos experimentos, si AAC(6') es una proteína de 26 kD o de 19 kD.

Con el objeto de analizar si ambas proteínas se expresan *in vivo*, se realizaron experimentos en un sistema de minicélulas. Estas son partículas esféricas, compuestas por pared, membrana, y contenido citoplasmático indistinguibles del de su célula parental, pero que no contienen ADN cromosomal (2). Se originan a partir de células mutantes de *E. coli*, defectivas en su división.

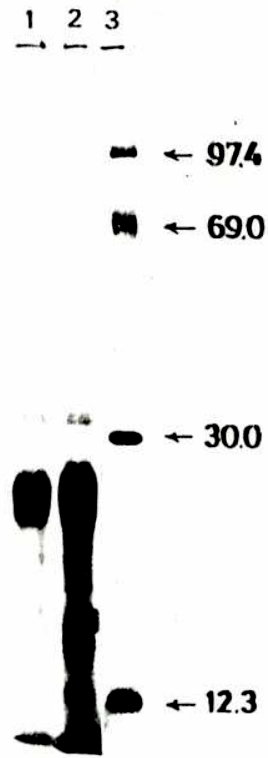


Figura 24. Transcripción y traducción *in vitro* de pJHCT15.2. Autorradiografía de electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida de los productos de transcripción y traducción *in vitro*, marcados con (^{35}S)metionina, de: carril 1, pBR325; carril 2, pJHCT15.2. El carril 3 corresponde a los marcadores de peso molecular.

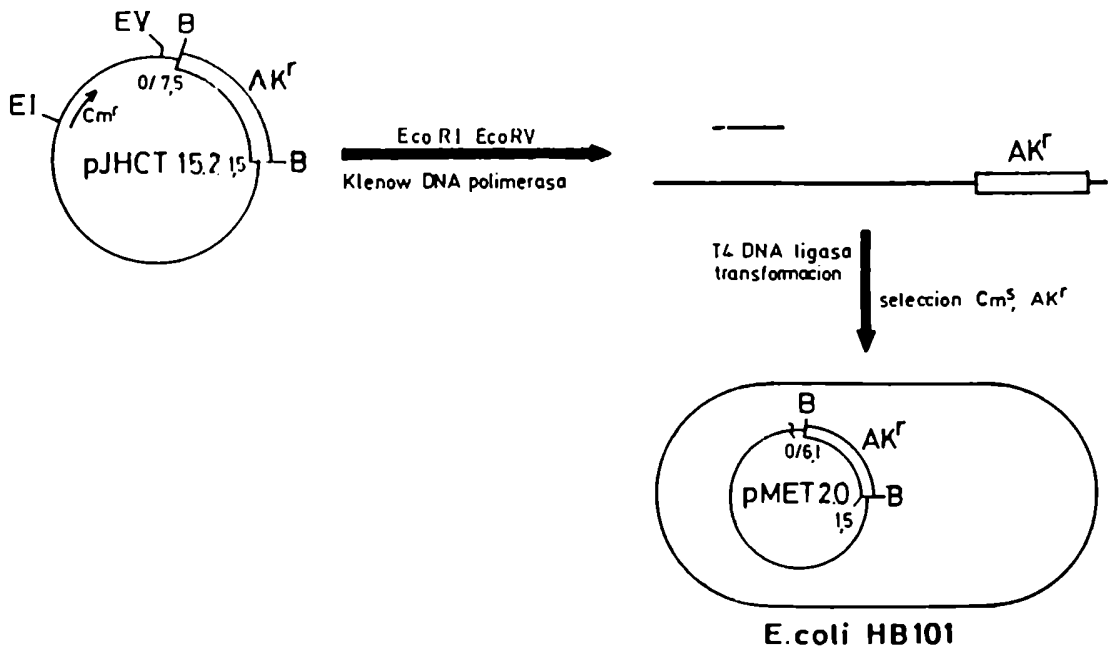


Figura 25. Construcción de pMET2.0. pJHCT15.2, construido por Tolmasky et al (177), fue digerido con EcoRI(EI) y EcoRV(EV), tratado con DNA polimerasa (fragmento Klenow), y religado con T4 DNA ligasa para eliminar el gen *cat* del vector. El producto de este tratamiento se empleó para transformar *E. coli* HB101 seleccionando por AK^r , Cm^S . Se obtuvo así *E. coli* HB101 (pMET2.0).

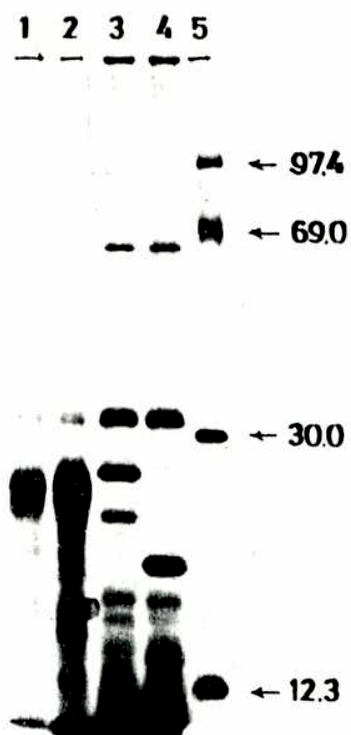


Figura 26. Transcripción-traducción *in vitro* de pMET2.0 y pMET2.1. Autorradiografía de electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida de los productos de transcripción y traducción *in vitro*, marcados con (^{35}S)metionina, de: carril 1, pBR325; carril 2, pJHC15.2; carril 3, pMET2.0; carril 4, pMET2.1. El carril 5 corresponde a los marcadores de peso molecular.

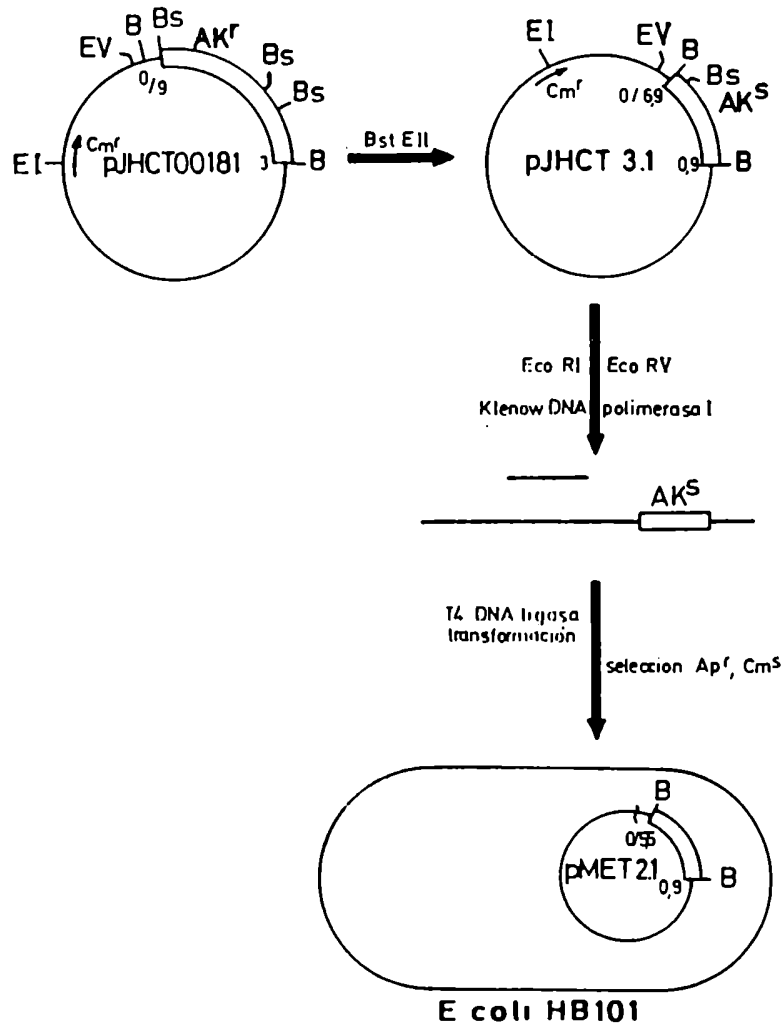


Figura 27. Construcción de pMET2.1. pJHCT3.1 fue generado por digestión de pJHCT00181 con BstEII (Bs), religación con T4 DNA ligasa y transformación de los productos en *E. coli* HB101 seleccionando por resistencia a Cm y sensibilidad a Ak (177). Este plásmido, que contiene un gen *aac* deletado, se digirió con EcoRI (EI) y EcoRV (EV), se rellenaron los extremos cohesivos con DNA polimerasa Klenow, se religó con T4 DNA ligasa y se utilizó para transformar *E. coli* HB101. La selección de transformantes se realizó por Ap^r, Cm^S. Las colonias con este fenotipo contenían pMET2.1, que carece de un fragmento de 1,4kbp contenido en pJHCT3.1 que contiene el gen *cat*.

En este caso se empleo *E. coli* DS410, que es una cepa mutante de *E. coli* K12 que produce regularmente un gran número de células pequeñas, anucleadas, durante su fase de crecimiento logarítmico. Si se generan minicélulas a partir de bacterias que contienen plásmidos, ellos pueden ser englobados durante la formación de la minicélula. La probabilidad que las minicélulas formadas contengan plásmidos provenientes de sus bacterias madre aumenta con el número de copias del plásmido en cuestión. Dado que contienen todos los factores presentes en el citoplasma de la bacteria parental; las minicélulas son capaces de realizar transcripción y traducción, y por lo tanto pueden expresar las determinantes genéticas de los plásmidos que contienen (152).

Para la identificación *in vivo* de la proteína AAC(6') producida por pJHCMW1 se transformó *E. coli* DS410 con pJHCT15.2 y con pJHCMW1. Las transformantes se cultivaron en presencia de Ak para la producción de minicélulas. Luego de separar las minicélulas de las células parentales completas por centrifugación en gradiente de sacarosa, se las incubó en presencia de aminoácidos marcados con ¹⁴C. La incubación se continuo en presencia de fuente de aminoácidos sin marcar, a fin de permitir que se completara la síntesis de los polipéptidos marcados. Las proteínas producidas se sometieron a PAGE desnaturalizante, revelando por tinción con Coomassie Blue y posterior autorradiografía. Las minicélulas conteniendo pJHCT15.2 produjeron β-lactamasa (32 kDa) y otra proteína de peso molecular 24,5-26 kD (Fig. 28, línea 1). En el caso de pJHCMW1 (Fig. 28, línea 2) se obtuvieron las mismas dos bandas. Si bien para pJHCT15.2 la banda de aproximadamente 26 kD puede corresponder a CAT, aparece un polipéptido de igual tamaño al utilizar pJHCMW1. Este plásmido no contiene gen *cat*, y por lo tanto no produce CAT. Entonces la banda de 24-26 kD presente para pJHCT15.2 debe corresponder a las proteínas CAT y AAC(6').

Ni para pJHCMW1 ni para pJHCT15.2 se sintetizó un polipéptido de 19 kD, como ocurría *in vitro*. La ausencia de este polipéptido en experimentos *in vivo* indica que AAC(6') es la proteína de 26 kD.

IV-7. Caracterización del plásmido pMET1.

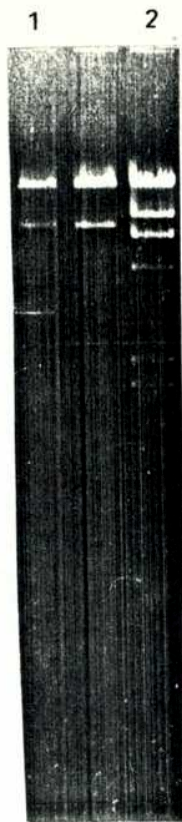
IV-7.1. Mapa de restricción.

La caracterización del plásmido pMET1 se llevó a cabo comenzando por su mapa físico. A tales efectos el plásmido fue digerido con distintas enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos en cada caso analizados por electroforesis en geles de agarosa. El tamaño de cada fragmento fue determinado por comparación con aquellos correspondientes a fago λ y a fago φX174, digeridos con HindIII y HaeIII, respectivamente. Las comparaciones se efectuaron en gráficos semilogarítmicos de tamaño en función de distancia migrada en el gel. A modo de ejemplo se muestran los resultados para una de las endonucleasas empleadas, XhoI, la cual produce tres fragmentos a partir de pMET1 (Fig. 29-A). Sus tamaños, obtenidos por comparación con los fragmentos de ADN producidos por digestión de fago con HindIII, fueron 3, 8 y 37 kpb (Fig. 29-B). Esto significa que pMET1 contiene tres sitios para XhoI, cuyas posibilidades de ubicación relativa se muestran en la figura 29-C. Combinando estos resultados con los obtenidos para otras endonucleasas, y los que rinden digestiones dobles o triples se puede determinar cuál de las posibilidades es la real (Fig. 29-C, posibilidad 1). De esta forma se confeccionó el mapa físico de pMET1 (Fig. 30).

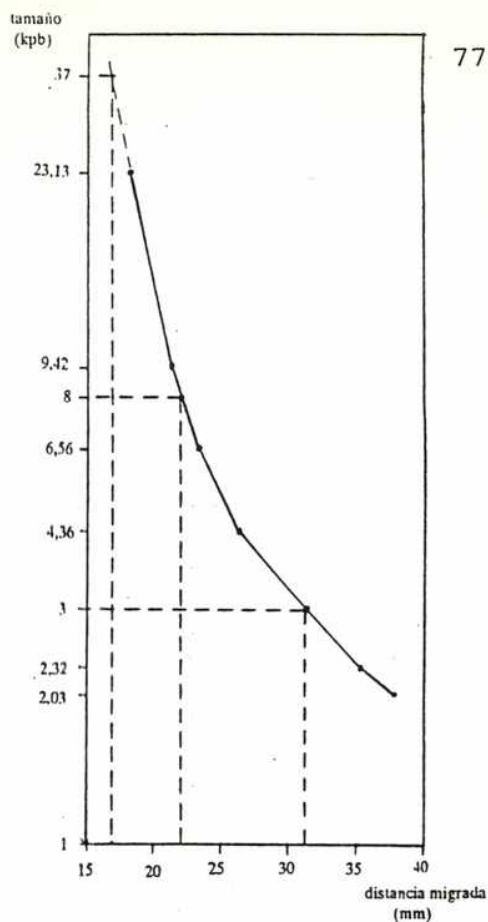


Figura 28. Producto de transcripción y traducción del gen *aac* en minicélulas. Autorradiografía de electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida de los productos de minicélulas, incubadas en presencia de una mezcla de aminoácidos marcados con ^{14}C , provenientes de *E. coli* DS410 conteniendo: carril 1, pBR325; carril 2, pJHCT15.2; carril 3, pJHCMW1. Se indican los marcadores de peso molecular.

A



B



C

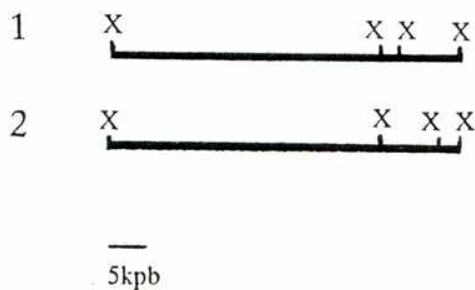


Figura 29. Determinación del mapa de restricción de pMET1. A- EGA de productos de digestión con XhoI de pMET1 (línea 1); en la línea 2 λ -HindIII, cuyos fragmentos visibles en este gel presentan tamaños de: 23,13; 9,42; 6,56; 4,36; 2,32 y 2,03 kbp.

B- Gráfico semilogarítmico de tamaño en función de distancia migrada por electroforesis en el gel A de los fragmentos de λ -HindIII. A partir de la distancia recorrida por los fragmentos provenientes de digestión con XhoI de pMET1 en el gel A, se obtiene su tamaño, gráficamente.

C- Ubicaciones relativas posibles de los sitios XhoI en pMET1.

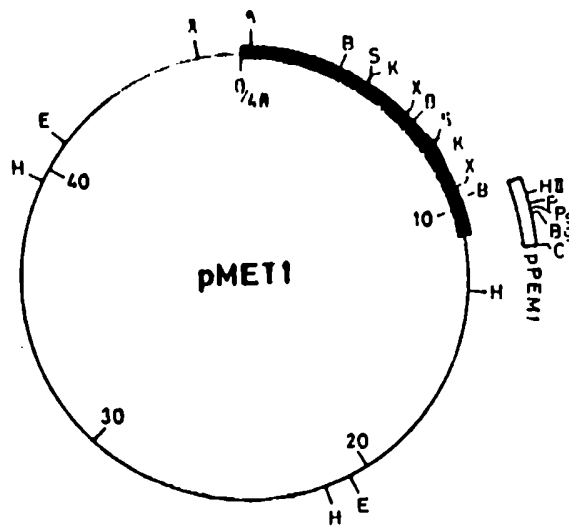


Figura 30. Mapa físico de pMET1. Los sitios de restricción son: B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; K, KpnI; S, SstI y X, XhoI. La barra blanca muestra el fragmento de pMET1 insertado en pJICP4 para la construcción de pPEM9, y sus sitios para Bg, BglI; HII, HindII; P, PvuI y Ps, PstI.

Durante el mapeo , al efectuar electroforesis en geles de agarosa revelando el ADN por tinción con bromuro de etidio y observación al ultravioleta, se esperaba que la intensidad de las bandas se correlacionara con el tamaño del fragmento. El ión etidio se intercala entre las bases de las moléculas de ADN y, por lo tanto, cuanto mayor sea el tamaño del fragmento y el número de bases que contiene, mayor será la cantidad intercalada y la intensidad de la banda.

Al digerir pMET1 con **Bam**HI y **Sst**I se obtenían cuatro fragmentos. El tercero de ellos, en orden decreciente de tamaño, presentaba mayor o igual intensidad que el segundo (Fig. 31-A). Se observó también durante el mapeo que el fragmento de 3 kpb proveniente de pMET1 por digestión con **Bam**HI (Fig. 31-B, carril 4) presenta mayor intensidad que segmentos de ADN del mismo tamaño provenientes de digestión de cantidades similares de ADN de otros plásmidos con endonucleasa, o de pMET1 con otras enzimas de restricción (Fig. 31-B). Estas observaciones llevaron a la conclusión que este fragmento debía encontrarse repetido en pMET1.

La opción más simple a considerar era la presencia de una repetición "en tandem" de la porción de ADN de 3 kpb comprendida entre sitios **Bam**HI. Si éste fuera el caso, al digerir el plásmido con cualquiera de las enzimas para las cuales existe un único sitio dentro de esa porción (**Xho**I, **Sst**I, **Pvu**I y **Kpn**I) debía obtenerse un fragmento de 3 kpb.

Por acción de **Sst**I, **Kpn**I o **Xho**I sobre pMET1 (Fig. 31-B, carriles 2, 3 y 5 respectivamente) se obtienen fragmentos de 3 kpb en cada caso; los cuales, para cantidades iguales de ADN presentan menor intensidad que el que se obtiene por digestión con **Bam**HI del mismo plásmido (Fig. 31-B, carril 4). Esto indica que nos encontramos realmente ante una repetición "en tandem" del fragmento **Bam**HI de 3 kpb presente en pMET1 (Fig. 30). Para averiguar cuántas veces se encuentra repetido este fragmento en pMET1 se digirió el plásmido con **Pst**I. La elección de esta enzima se debió a que pMET1 contiene sitios de restricción para ella a ambos lados de los sitios **Bam**HI que flanquean el fragmento repetido (Fig. 30). Esta característica hace que uno de los fragmentos de ADN que se obtienen por acción de **Pst**I tenga un tamaño dependiente del número de veces que se encuentre repetido el fragmento **Bam**HI de 3 kpb.

A partir del mapa físico de pMET1 puede deducirse que si se tratase de una "duplicación" en tandem **Pst**I rendiría una banda de ADN correspondiente a un tamaño de 9,4 kpb; si el fragmento se encontrase presente por "triplicado", 12,4 kpb; y así sucesivamente. Si hubiese una "única" copia presente rendiría un fragmento de 6,4 kpb (Fig. 32). Por digestión de pMET1 con **Pst**I se obtiene un fragmento de 9,4 kpb (Fig. 32); por lo tanto pMET1 contiene una **duplicación** "en tandem" de un fragmento de 3 kpb. El fragmento duplicado contiene al gen *aac* y es por lo tanto responsable de la resistencia a Ak, Km y Tm.

IV-7.2. Comparación física de pMET1 con Tn3.

Por comparación entre los mapas físicos de pMET1 y de algunos transposones se observó que existe analogía entre algunas regiones de pMET1 y del transposón Tn3. Esto llevó a un estudio comparativo exhaustivo, en el que se buscó la presencia de genes pertenecientes a Tn3 en pMET1.

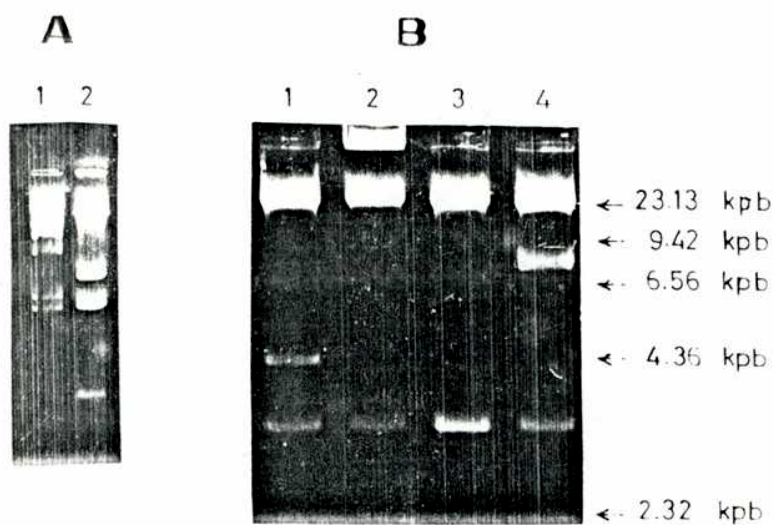


Figura 31. Presencia de un fragmento repetido "en tandem" en 'MET1. A- EGA de: carril 1, λ -HindIII; carril 2, pMET1 digerido con BamHI y SstI. B- EGA de pMET1 digerido con: carril 1, SstI; carril 2, KpnI; carril 3, BamHI; carril 4, XhoI. Se indica el tamaño de los fragmentos de λ -HindIII usados como marcadores.



Figura 32. pMET1 contiene un fragmento duplicado. EGA de digestión con PstI de: carril 2, pJHCMW1; carril 3, pMET1. El carril 1 es λ -HindIII.

IV-7.2.1. *mpA*.

La figura 33 muestra los mapas de restricción de Tn3 (85), contenido en el plásmido RSF2124 (164) y pMET1, para **Bam**HI, **Sst**I y **Eco**RV; y la localización del gen *mpA* para RSF2124. Este último plásmido fue empleado para preparar una sonda radioactiva de ADN conteniendo secuencias de *mpA* de Tn3. Para ello se lo digirió con **Eco**RV, y se purificó y marcó con (³²P) α -ATP el fragmento de 2,5 kpb obtenido (Fig. 33, sonda 1). Este fragmento de ADN se encuentra íntegramente comprendido en el gen *mpA* de Tn3 (Fig. 33)

Los plásmidos RSF2124 y pMET1 fueron digeridos doblemente con **Bam**III y **Sst**I y sometidos a electroforesis es gel de agarosa (Fig. 34-A). Los fragmentos de ADN se transfirieron a papel de nitrocelulosa, se desnaturalizaron, y se hibridaron con la sonda de *mpA* preparada a partir de RSF2124. En el caso de RSF2124 se obtuvo hibridación para un fragmento de ADN de 3,3 kpb (Fig. 34-B, línea 3), que contiene al gen *mpA*. Para pMET1 se obtuvo hibridación de un fragmento, también de 3,3 kpb (Fig. 34-B, línea2). Este fragmento puede localizarse en pMET1, en base a su mapa de restricción (Fig. 30).

El fragmento de 3,3 kpb de pMET1 que hibrida con el gen *mpA* de Tn3 fue separado de los demás productos de digestión de este plásmido con **Bam**HI y **Sst**I en geles de agarosa de bajo punto de fusión. El fragmento contenido en agarosa de bajo punto de fusión (108) se sometió a la acción de distintas enzimas de restricción, separando los productos por electroforesis en gel de agarosa. De esta forma se determinó que existen sitios **Cla**I, **Eco**RV, **Pst**I y **Bgl**II de ubicación idéntica en el fragmento proveniente de pMET1 a los que se encuentran en *mpA* de Tn3.

La identidad de sitios de restricción y la homología de esta región de pMET1 con el gen *mpA* de Tn3 constituyen fuerte evidencia de la existencia de un gen *mpA* en este plásmido. Esto a su vez sugiere la presencia de un elemento transponible en pMET1, probablemente perteneciente a la familia de transposones Tn3.

IV-7.2.2. *mpR*.

Dada la presencia en pMET1 de un fragmento de ADN homólogo al gen *mpA* de Tn3, se decidió determinar si existe además alguna secuencia homóloga a *mpR* del mismo transposón, lo cual indicaría la probable presencia de una secuencia transponible relacionada a Tn3. El gen *mpR* codifica la enzima resolvasa, encargada de la resolución de coíntegrados formados entre Tn3 y la molécula de ADN aceptora de transposición.

Para determinar su presencia o ausencia en pMET1, se digirió este plásmido con **Bam**III y **Eco**RV. Los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa, se transfirieron a papel de nitrocelulosa e hibridaron usando como sonda un fragmento proveniente de RSF2124, obtenido por digestión doble con **Hae**II y **Bam**HI. Esta sonda corresponde al gen *mpR* de Tn3 (Fig. 33, sonda 2).

La figura 35 muestra en su parte **A** el gel obtenido luego de la electroforesis mencionada y en su parte **B** la hibridación correspondiente. Se obtuvo hibridación para una banda de pMET1, indicando la presencia de secuencias homólogas a *mpR* en esa región.

La presencia en pMET1 de secuencias homólogas a los genes *mpA* y *mpR* de Tn3, responsables de su transposición; sugiere la probable existencia de un transposón perteneciente a esta familia en el plásmido.

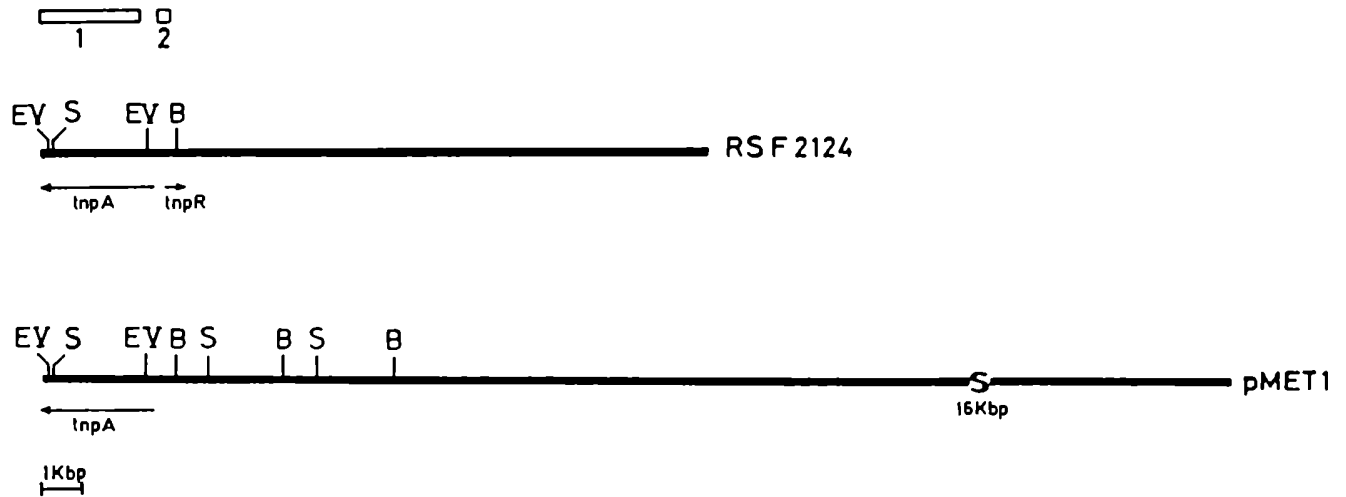


Figura 33. Mapas físicos de RSF2124 y pMET1. Mapas de restricción para las enzimas BamHI, B; SstI, S; y EcoRV, EV; de el transposón Tn3 insertado en ColE1, formando el plásmido RSF2124, y pMET1. Las flechas indican la localización del gen *mpA* para cada caso y *mpR* para Tn3. Las barras blancas representas los fragmentos de ADN de RSF2124 empleados como sondas para *mpA* (1) y *mpR* (2).

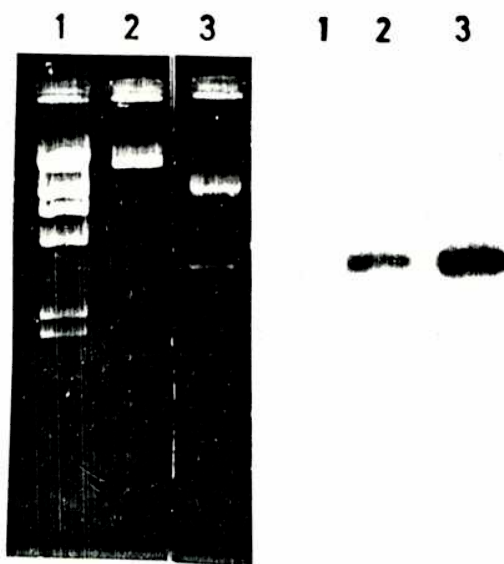


Figura 34. Localización de secuencias homólogas a *tnpA* en pMET1. A- EGA de productos de digestión con **Bam**HI y **Sst**I de: línea 2, pMET1; línea 3, RSF2124. La línea 1 es λ -**Hind**III. B- Autorradiografía de hibridación del gel A transferido a nitrocelulosa con sonda radiactiva del fragmento **Eco**RV de 2,5kbp de RSF2124 (sonda 1 en Fig. 33).

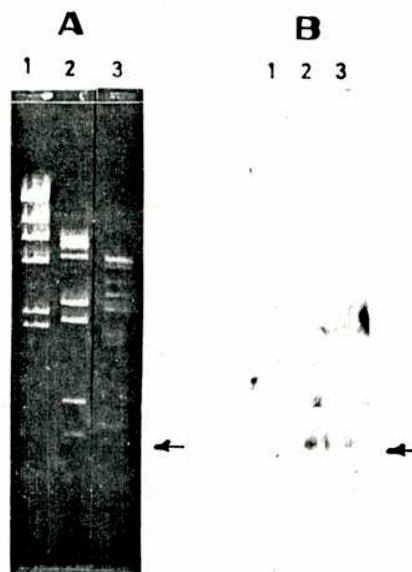


Figura 35. Localización en pMET1 de secuencias homólogas a *mpR*. A- EGA de productos de digestión con **Bam**HI y **Eco**RV de: línea 2, RSF2124; línea 3, pMET1. La línea 1 es λ -**Hind**III. B- Autorradiografía de hibridación del gel A transferido a nitrocelulosa con sonda radiactiva del fragmento **Hae**II-**Bam**HI de RSF2124 que contiene *mpR* (Fig. 33, sonda 2).

IV-7.2.3. *bla*.

Al ubicar las zonas homólogas a *mpA* y *mpR* en pMET1, la comparación entre su mapa físico (Fig. 30) y el de Tn3 muestra identidad, en cuanto a sitios de restricción, entre una región de ADN que comprende al gen *bla* en Tn3, y una zona de pMET1 que presenta la misma ubicación respecto de regiones homólogas a *mpR*.

A fin de estudiar el gen *bla* se decidió clonar el fragmento de ADN que codifica β -lactamasa, y por lo tanto confiere resistencia a Ap, en pMET1. El vector elegido fue el plásmido pJHCP4 (140). Este plásmido es un derivado de pBR325 en el cual se han delecionado las determinantes genéticas para resistencia a Ap, por lo tanto confiere resistencia solamente a Tc y Cm.

Se digirió ADN de los plásmidos pMET1 y pJHCP4 con **ClaI** y **BamHI**. Los fragmentos obtenidos fueron reunidos en una sola fracción, precipitados y ligados por acción de T4 DNA ligasa. El producto de este tratamiento se utilizó para transformar *E. coli* HB101. La selección de transformantes fue por resistencia a Ap y a Cm, para el fragmento de pMET1 portador del gen *bla* y pJHCP4, respectivamente (Fig. 36). Las colonias resultantes contenían un plásmido denominado pPEM9. Al digerir este plásmido con **BamHI** y **ClaI** se obtenían fragmentos correspondientes a la región que contiene secuencias para la replicación de pJHCP4, y a un inserto de 1,7 kpb proveniente de pMET1 (Fig. 37)

El plásmido recombinante pPEM9 fue analizado mediante cortes con enzimas de restricción y electroforesis de los fragmentos de ADN obtenidos en geles de agarosa. De esta forma se localizaron los sitios para **BglI**, **HindIII**, **PstI** y **PvuI** contenidos en el inserto proveniente de pMET1. La ubicación de estos sitios (Fig. 38) fue idéntica a la que presentan en el gen *bla* de Tn3 (Fig. 38).

La coincidencia de ubicación y orientación de genes *mpA*, *mpR* y *bla* en Tn3, y sus homólogos en pMET1 (Fig 38), detectada por mapeo físico e hibridación; sugiere fuertemente la presencia de un transposón de la familia Tn3, subgrupo Tn3, en este plásmido. Para confirmar dicha presencia se debe demostrar fisiológicamente que dicha secuencia de ADN es capaz de transponer.

IV-7.3. Comparación de pMET1 con pJHCMW1.

En la sección anterior se demostró la existencia de secuencias correspondientes a Tn3 en pMET1. Al comparar los mapas físicos de Tn3 con regiones homólogas en pMET1 (Fig. 39) se observa que difieren en un fragmento de ADN de 6 kpb que presenta pMET1. Este fragmento consta de la región de pMET1 duplicada "en tandem", que contiene su gen *aac*, y es responsable de su capacidad de conferir resistencia a aminoglicósidos.

En las secciones IV-2.4 y IV-2.5 se demostró identidad entre los genes *aac* presentes en pMET1 y en pJHCMW1. En 1986, Tolmasky et al (176) demostraron que pJHCMW1 contiene un transposón de 8 kpb, Tn1331, que incluye al gen *aac*. Tn1331 pertenece a la familia de transposones Tn3, subgrupo Tn3. El conjunto de estas observaciones llevó a comparar detalladamente pMET1 con pJHCMW1, a fin de determinar si son plásmidos relacionados o si contienen secuencia transponibles relacionadas. De ser así se concluiría que la propagación de ese plásmido o ese transposón ha sido responsable de la diseminación del gen *aac* y que por lo tanto ese elemento es de importancia epidemiológica.

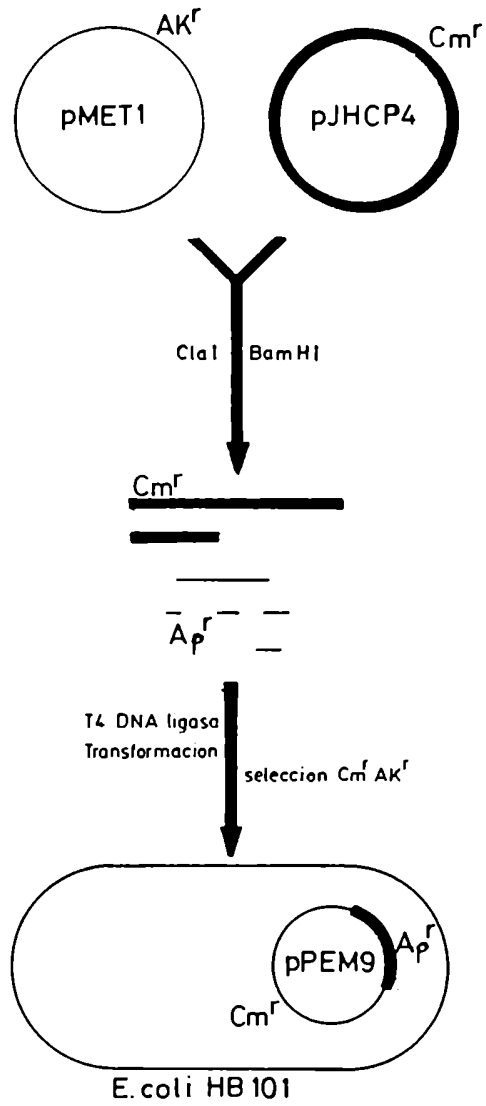


Figura 36. Construcción de pPEM9. pMET1 y pJHCP4 fueron digeridos con $ClaI$ y $BamHI$. Los productos se trataron con T4 DNA ligasa y se introdujeron en *E. coli* HB101 por transformación, seleccionando por resistencia a Ap y Cm .

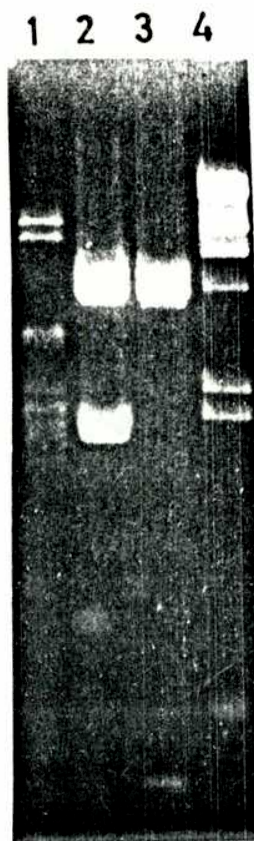


Figura 37. Estructura de pPEM9. EGA de digestión con **Bam**HI y **Cla**I de: carril 1, pMET1; carril 2, pPEM9; carril 3, pJHCP4. El carril 4 es λ -**Hind**III.

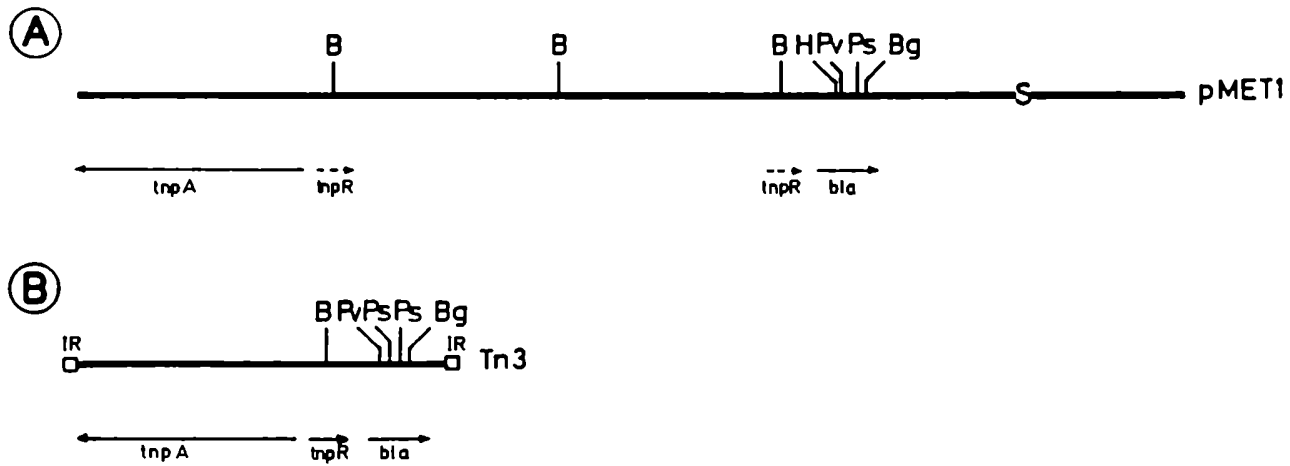


Figura 38. Mapa físico del gen *bla* en pMET1. Mapa de restricción de los genes *bla* de A- pMET1; B- Tn3. B=BamHI; Bg=BglI; C=Clal; H=HindII; Ps=PstI; Pv=PvuI

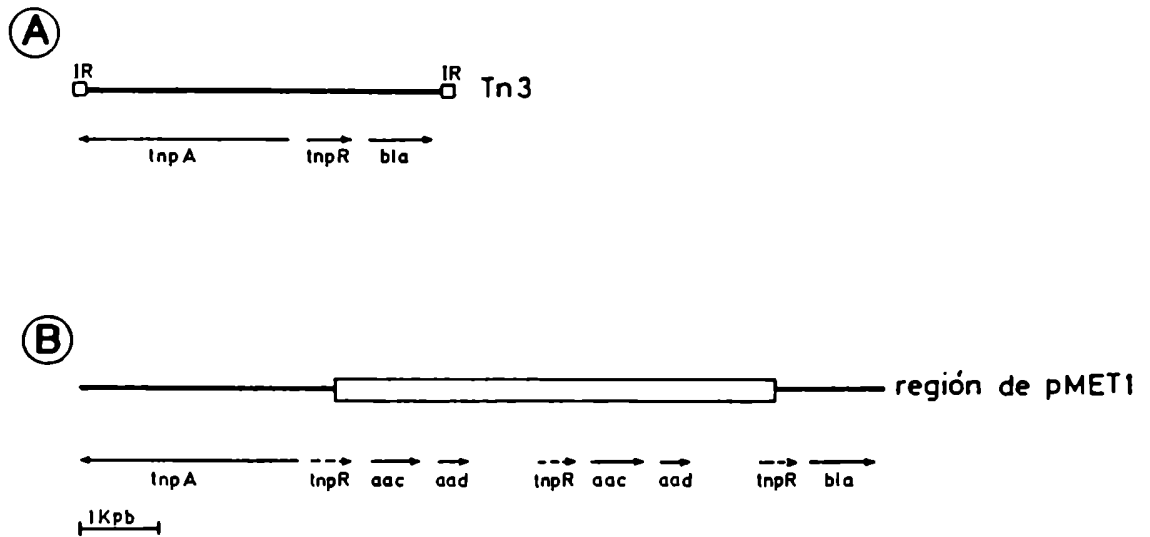


Figura 39. Comparación entre Tn3 y una región de pMET1. Mapas físicos de: A- Tn3; B- región de pMET1 de 11 kbp. Se indican los genes *tnpA*, *bla*, *tnpR* y regiones homólogas a *tnpR* (con flechas en líneas de puntos). La barra blanca muestra las secuencias de pMET1 que no presentan análogos en Tn3.

Los mapas físicos de pMET1 y pJHCMW1 (Fig. 40) muestran identidad para todas las regiones correspondientes a Tn1331, a excepción de la presencia de una región adicional de 3 kpb en pMET1. Esta secuencia es una repetición exacta de su zona inmediatamente adyacente, la cual también se encuentra presente en pJHCMW1 (Fig. 40, línea quebrada).

Para determinar si los sistemas de replicación de ambos plásmidos están relacionados se efectuaron experimentos de hibridación entre pMET1 y el fragmento EcoRI de 2,3 kpb de pJHCMW1, empleado como sonda. Este fragmento contiene las secuencias de pJHCMW1 no comprendidas por Tn1331. En este experimento la sonda no hibrida con ningún fragmento de pMET1, mientras que sí lo hace con un segmento de pJHCMW1 usado como control (Fig. 41). Por lo tanto las secuencias de pJHCMW1 que no corresponden al transposón Tn1331 no presentan homología con pMET1; es decir que los sistemas de replicación de ambos plásmidos no están relacionados. Para confirmarlo se efectuaron experiencias de compatibilidad entre pJHCMW1 y pMET1. Dado que estos plásmidos codifican para resistencia a los mismos antibióticos y por lo tanto no puede diferenciarse entre la presencia de alguno de ellos o ambos en una misma célula utilizando medios selectivos, se emplearon derivados de ellos. Los plásmidos usados fueron pROX2 y pMET14. El plásmido pROX2 es un derivado deleciónado de pMET1, formado por su fragmento BamHI de 42 kpb, que contiene al gen *bla* y no al gen *aac* (Fig. 42); pMET14 es un derivado deleciónado de pJHCMW1 que carece del fragmento HincII de menor tamaño (Fig. 43) y ha perdido la capacidad de conferir resistencia a Ap, pero conserva el gen *aac* (Fig. 43). Ambos plásmidos se introdujeron en *E. coli* HB101 por transformación, seleccionando por resistencia a Ap y Ak. La cepa obtenida, *E. coli* (pMET14-pROX2), se cultivó en ausencia de antibióticos y al cabo de varias generaciones se sembraron alícuotas de este cultivo en medio sólido y se incubó a 37°C. Las colonias obtenidas se transfirieron a medio de cultivo conteniendo Ap o Ak. Todas las colonias que crecían en presencia de Ap lo hacían también en presencia de Ak y viceversa, indicando la presencia de pMET14 y pROX2 en las células. Por lo tanto ambos plásmidos son compatibles, y también lo son los plásmidos pMET1 y pJHCMW1 que les dieron origen y cuyos sistemas de replicación conservan.

Dado que las regiones de replicación de pMET1 y pJHCMW1 no son homólogas, y que ambos plásmidos son compatibles, estos plásmidos no están relacionados entre sí, y fuera de la región comparable a Tn1331, pMET1 y pJHCMW1 difieren totalmente.

La identidad entre el fragmento BamHI de 3 kpb presente en una única copia en pJHCMW1 y en dos en pMET1 ha sido demostrada por mapeo físico, clonado y homología en la sección IV-4. También se ha comprobado bioquímicamente que las AAC(6') codificadas en esta región en ambos plásmidos son idénticas (sección IV-5). Este fragmento de 3 kpb contiene, además de *aac*, el gen responsable de resistencia a Sm en ambos casos. Para pJHCMW1 este gen, *aad*, ha sido ubicado con exactitud (176); por secuenciación de una parte del mismo (130) se pudo deducir que codifica una aminoglicósido³,9-adeniltransferasa.

El mapa de restricción de la zona que contiene *aad* en pJHCMW1 es idéntico al de la región comparable de pMET1. Esto se demostró por clonado de las determinantes para Sm^r presentes en pMET1 y mapeo del clon. Las secuencias de pMET1 clonadas correspondieron al fragmento BamHI-SstI de 2,2 kpb (Fig. 44-A). El mapa físico de ese fragmento resultó idéntico al de la secuencia comparable de Tn1331 (Fig. 44-B).

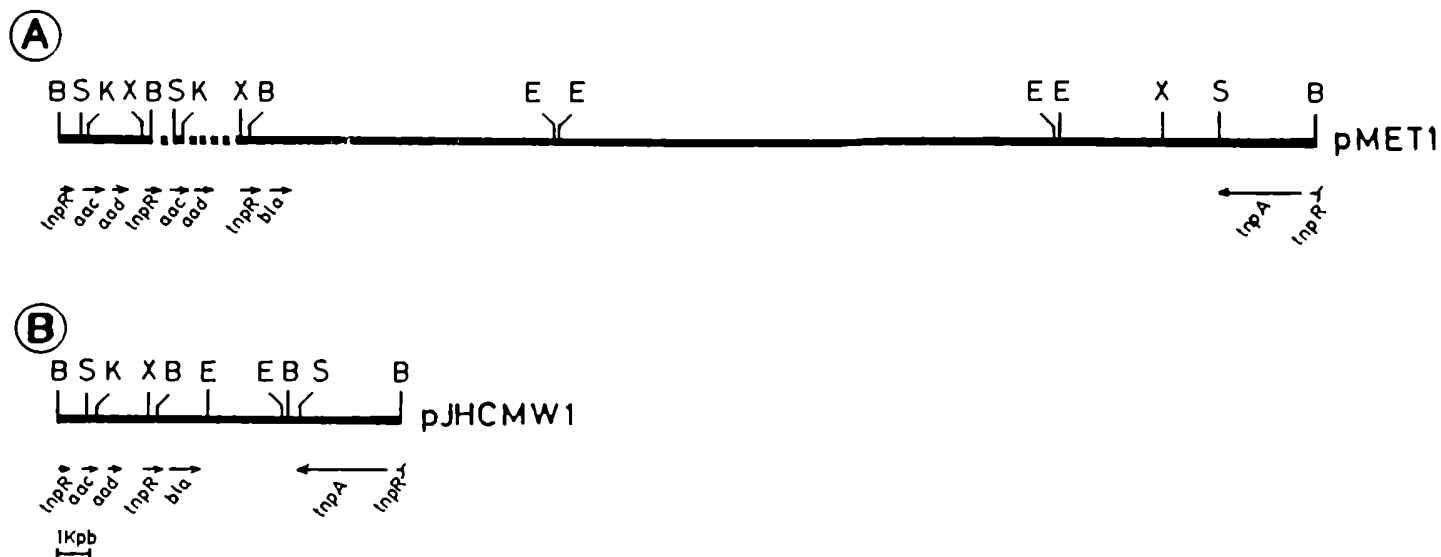


Figura 40. Mapas de restricción y genéticos de pMET1 y pJHCMW1. Mapas físicos de A- pMET1; B- pJHCMW1. Se indican los genes *mpA*, *mpR*, *bla*, *aac*, y *aad*. La línea quebrada indica la región de ADN que se encuentra duplicada en pMET1. B=BamHI; E=EcoRI; K=KpnI; S=SstI; X=XhoI

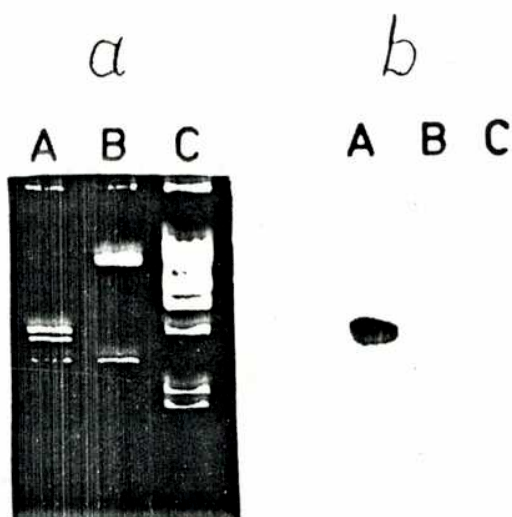


Figura 41. Hibridación de la región que contiene el sistema de replicación de pJHCMW1 con pMET1. **a-** EGA de productos de digestión con **Bam**HI de: **A-** pJHCMW1, **B-** pMET1; **b-** hibridación de los fragmentos del gel **a** con sonda compuesta por el fragmento **Eco**RI de 2,3 kpb de pJHCMW1, marcado con ^{32}P . Las líneas **C** corresponden a ADN de fago λ digerido con **Hind**III.

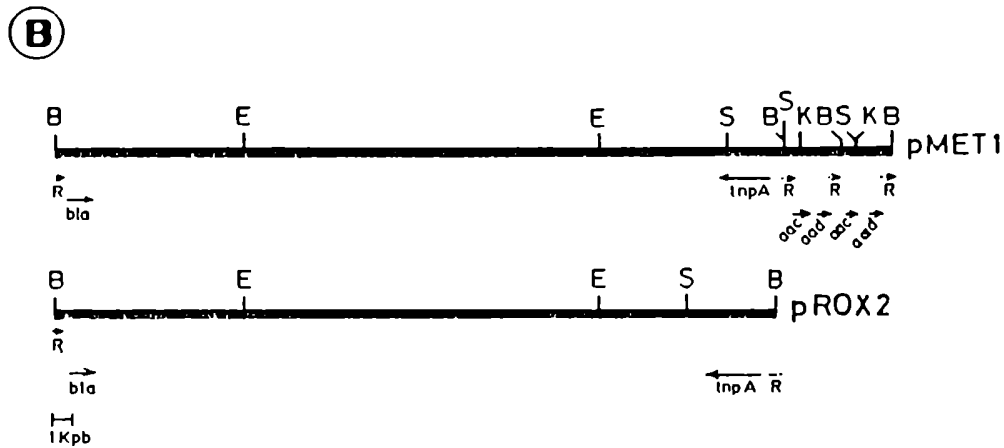
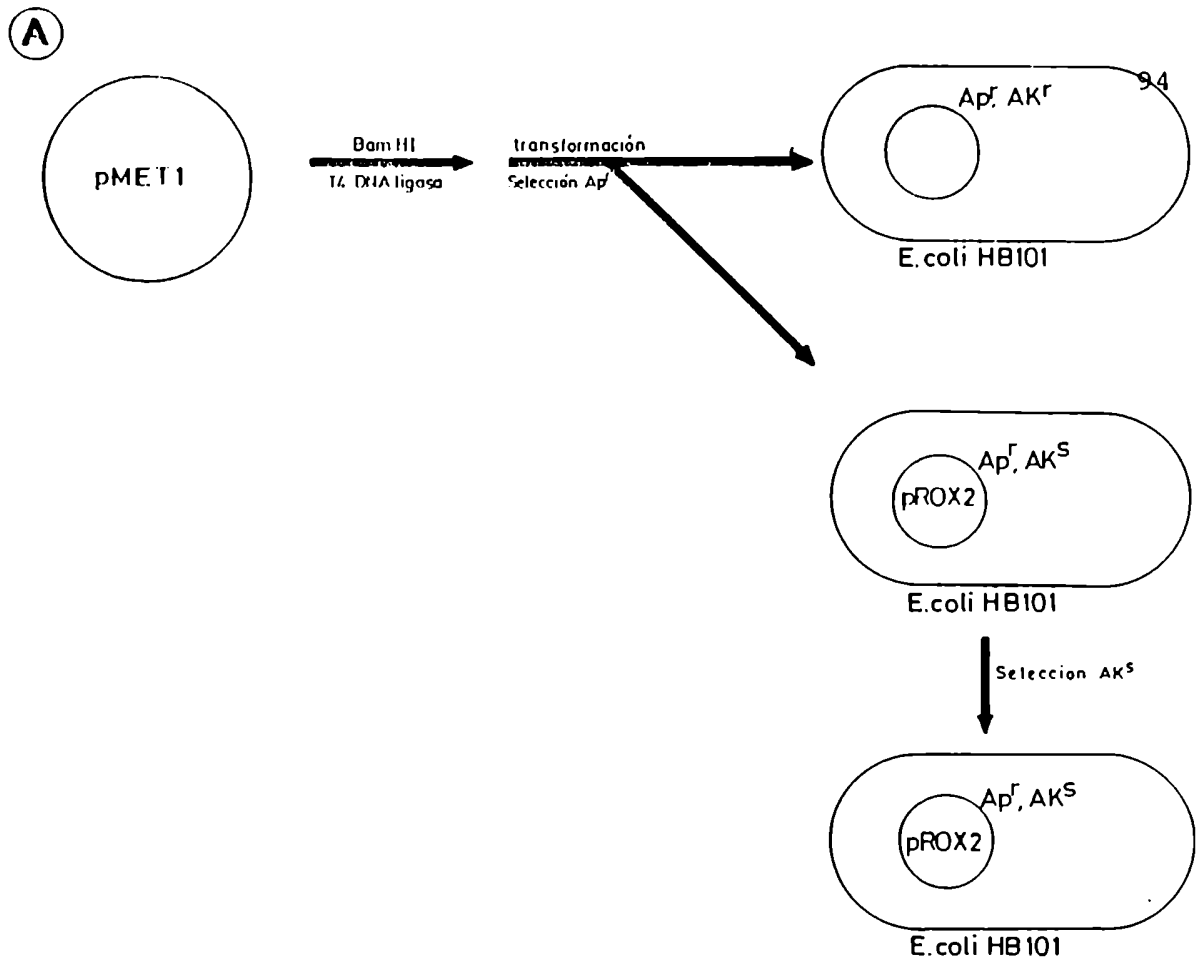


Figura 42. pROX2. a- Esquema de obtención de pROX2. ADN de pMET1 fue digerido con BamII, ligado con T4-DNA ligasa, y transformado en *E. coli* HB101 seleccionando por resistencia a Ap y sensibilidad a Ak. b- Mapa físico y genético de pMET1 y pROX2. Se indican los genes *tnpA*, *tnpR*, *aac* y *bla*.

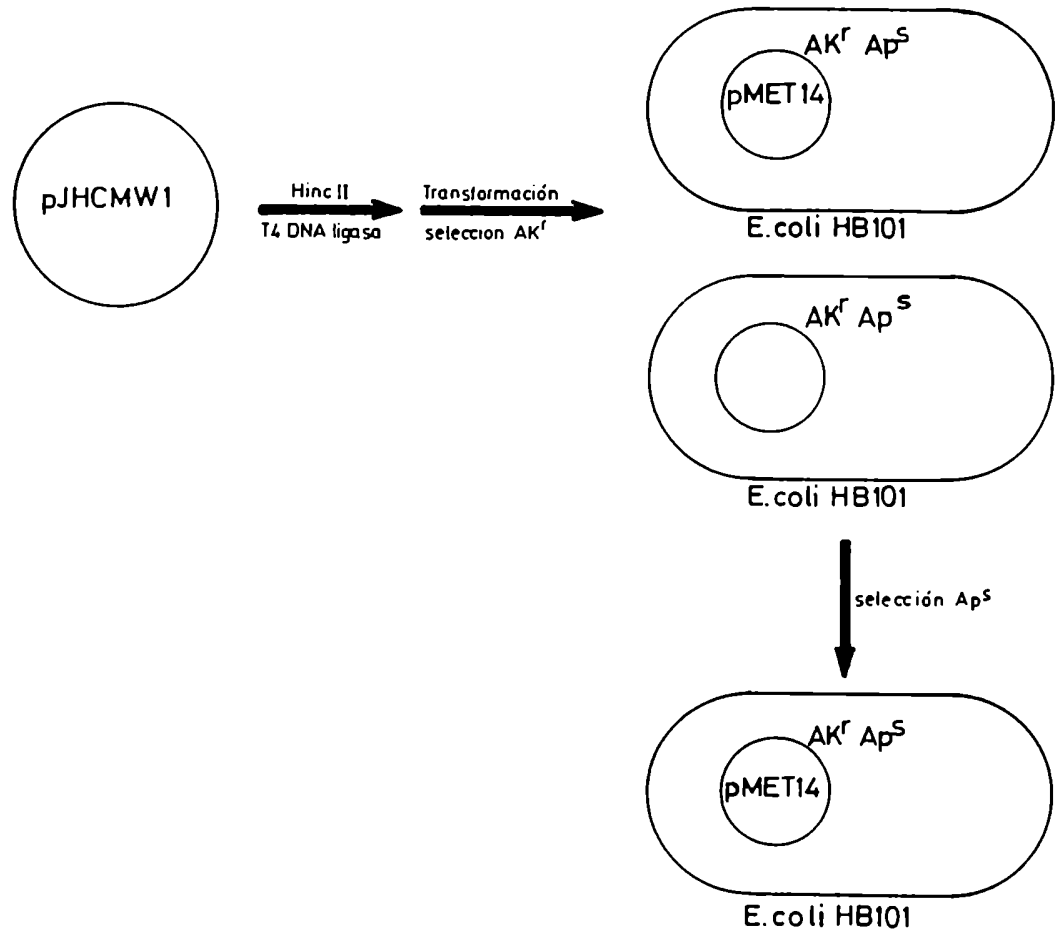


Figura 43. Construcción de pMET14. pJHCMW1 se digirió parcialmente con **HincII**, luego de ligar los fragmentos resultantes con T4 DNA ligasa se transformó *E. coli* HB101 con los productos, seleccionando por resistencia a Ak^r . Las colonias obtenidas se transfirieron a medio de cultivo conteniendo Ap, escogiendo las que fueron Ap^S.

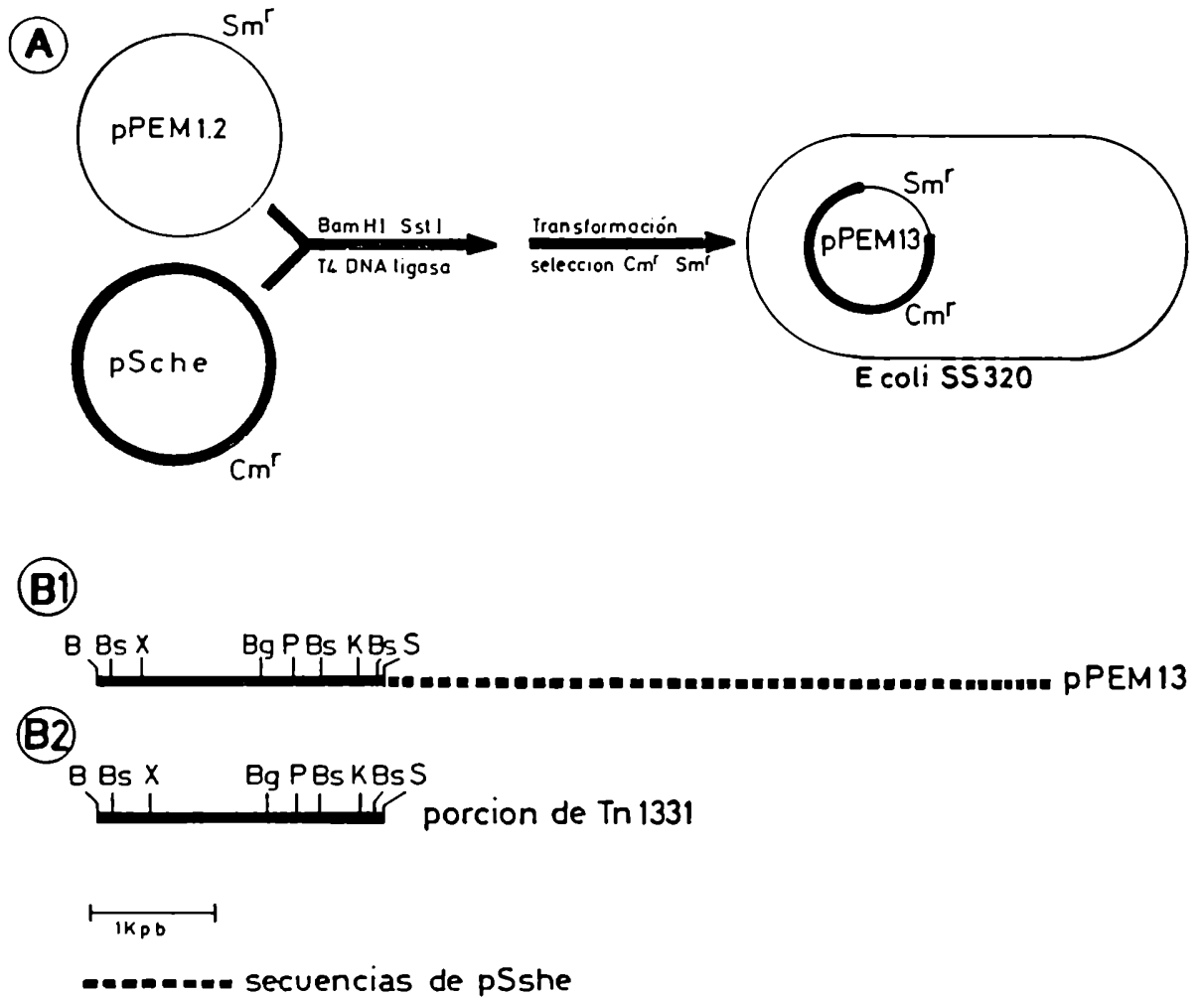


Figura 44. Construcción y mapa físico de pPEM13. A- Se digirieron pPEM1.2 (Fig. 58 y sección III-8.) y pSshe con BamHI y SstI; los productos, ligados por medio de T4 DNA ligasa se transformaron en *E. coli* SS320, seleccionando por Cm^r, para el fragmento proveniente de pSshe y Sm^r para el gen *aad* de pMET1, contenido en pPEM1.2. Las colonias obtenidas contenían el plásmido pPEM13, cuyo mapa de restricción se muestra en B-1. En B-2 se representa la porción de Tn1331 que corresponde a *aad*. B, BamHI; Bg, BglI; Bs, BstEII; K, KpnI, P, PvuI; S, SstI; X, XhoI.

La única zona de pMET1 relacionada con pJHCMW1 corresponde al transposón presente en este último, Tn1331. Sus secuencias son idénticas a una región de pMET1 en todo, salvo la duplicación de un fragmento de 3 kpb presente en pMET1. Esto refuerza la hipótesis acerca de la probable presencia de un transposón en pMET1, la cual debe ser demostrada funcionalmente.

IV-8. Aislamiento del transposón Tn1331.2.

La sospecha acerca de la existencia de un transposón en pMET1, como consecuencia de la presencia en él de secuencias que así lo sugieren, llevó a la necesidad de demostrar fisiológicamente su transposición.

Algunas estrategias usadas habitualmente para aislar transposones consisten en poner en contacto al plásmido dador y receptor de transposón en una misma célula, y eliminar posteriormente al dador. Una forma de lograrlo es a través de conjugación, si el plásmido donador es no movilizable. En este caso las células receptoras en la conjugación se seleccionan para las determinantes genéticas del transposón y para el plásmido receptor. Estas células contendrán el plásmido receptor con el transposón insertado, o bien un cointegrado formado por ambos plásmidos y movilizado por el receptor. Otra posibilidad es que el plásmido dador sea incapaz de replicar en células con alguna característica particular, como por ejemplo mutantes para DNA polimerasa I. Conviene entonces conjugar una cepa bacteriana que contenga el plásmido dador y otro que actúe como receptor de transposición, con células receptoras que posean la característica en cuestión. La selección de transconjugantes se hace para las bacterias receptoras, el plásmido receptor y el transposón. Solamente crecerán aquellas células que contengan el plásmido receptor con el transposón insertado, o los correspondientes cointegrados. En este último caso el plásmido receptor provee las funciones para replicación.

pMET1 no es un plásmido adecuado para las estrategias descritas. Por un lado es conjugativo (ver sección IV-3.) y se encuentra dereprimido para su transferencia por conjugación, imposibilitando aprovechar la primera posibilidad mencionada. Por otro lado este plásmido es capaz de replicar en todas las cepas bacterianas en las que se introdujo, incluidas mutantes *polA*, eliminando la segunda posibilidad.

Se intentó encontrar incompatibilidad entre pMET1 y algún otro plásmido, que sería entonces empleado como receptor de transposición. En este caso se introducirían ambos plásmidos en una célula bacteriana, y luego de conjugación con alguna cepa receptora, se seleccionarían aquellas transconjugantes que contuvieran el plásmido receptor y determinantes genéticos marcadores del hipotético transposón. Sería de esperar que por incompatibilidad, las bacterias que conservasen el plásmido receptor, no contuvieran también al dador de transposición. Alternativamente, podría cultivarse durante varias generaciones la cepa bacteriana conteniendo los plásmidos incompatibles. Las condiciones de cultivo debieran ser selectivas para aquellas células en que el plásmido receptor haya segregado a pMET1, y para marcadores de secuencias presuntamente contenidas en el transposón. Luego del aislamiento de las distintas cepas obtenidas, debiera confirmarse, en todos los casos que pMET1 no se halla también presente en las mismas, y analizar el plásmido que contuvieran.

La búsqueda de un plásmido incompatible con pMET1 resultó infructuosa. Fue necesario entonces idear una nueva estrategia para detectar transposición en este caso. Con este fin se intentó construir un derivado no conjugativo y no movilizable de pMET1 y emplearlo en la primera estrategia descrita. Para ello se digirió pMET1 con EcoRI y se religaron los fragmentos de

ADN obtenidos mediante la acción de T4 DNA ligasa. El producto de esta reacción se introdujo en *E. coli* HB101 por transformación, seleccionando cepas transformantes resistentes a Ak (Fig. 45). Las cepas obtenidas contenían un plásmido, pPEM1.2, que fue analizado por digestión con EcoRI y electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos. Los resultados (Fig. 46) muestran que pPEM1.2 está formado por el fragmento EcoRI de 27,5 kpb de pMET1; y que por lo tanto contiene todas las secuencias de pMET1 homólogas a Tn3 y a Tn1331 y carece de un fragmento de ADN de 20,5 kpb presente en el plásmido original (Fig. 40). A fin de determinar si pPEM1.2 es un plásmido conjugativo se realizaron conjugaciones entre *E. coli* HB101 (pPEM1.2) y *E. coli* C2110, seleccionando transconjugantes por resistencia a Nal para *E. coli* C2110 y a Ak para pPEM1.2. Como testigo se conjugó *E. coli* HB101 (pMET1) con *E. coli* C2110, a fin de comprobar que las condiciones usadas eran adecuadas. Los resultados (Tabla XII) demuestran que pPEM1.2 es un plásmido no conjugativo; por lo tanto, el fragmento de 20,5 kpb delecionado de pMET1 para formar pPEM1.2 debe contener genes *tra* esenciales para la conjugación.

Tabla XII. pPEM1.2, derivado no conjugativo de pMET1.

cepas conjugadas	crecimiento en	
	Nal-Ak	Ak
<i>E. coli</i> HB101 (pMET1) x <i>E. coli</i> C2110	+	+
<i>E. coli</i> HB101 (pPEM1.2) x <i>E. coli</i> C2110	-	+

Las cepas mencionadas se conjugaron durante 16 horas a 37°C en medio sólido, seleccionando luego transconjugantes en medio de cultivo conteniendo los ABs indicados en cada caso. La cepa recipiente *E. coli* C2110 es *polA gyrA*.

+ indica que se obtuvieron colonias transconjugantes con esta selección

- indica que no se obtuvieron colonias transconjugantes con esta selección

Posteriormente se diseñó un experimento para averiguar si pPEM1.2 es un plásmido movilizable, ya que si éste posee la región *rlx* o el *oriT* será movilizable. Para ello se repitió el experimento de conjugación anterior, agregando *E. coli* HB101 (pRK2013), en conjugaciones triparentales. El plásmido pRK2013 provee las funciones *tra*, que pueden ser capaces de complementar la ausencia de las mismas en pPEM1.2 y producir la movilización del plásmido a partir del *oriT*. Como testigo se efectuó un experimento de conjugación triparental entre *E. coli* HB101 (pVK102), *E. coli* HB101 (pRK2013) y *E. coli* C2110. pVK102 es un plásmido no conjugativo, pero si movilizable por pRK2013. Los resultados (Tabla XIII) indican que este es el caso también para pPEM1.2, el cual es entonces un plásmido no conjugativo, movilizable. Esta no es la situación ideal, ya que debería ser no conjugativo y no movilizable, sin embargo como se verá mas adelante el inconveniente se subsanó por medio de una modificación en los tiempos de conjugación.

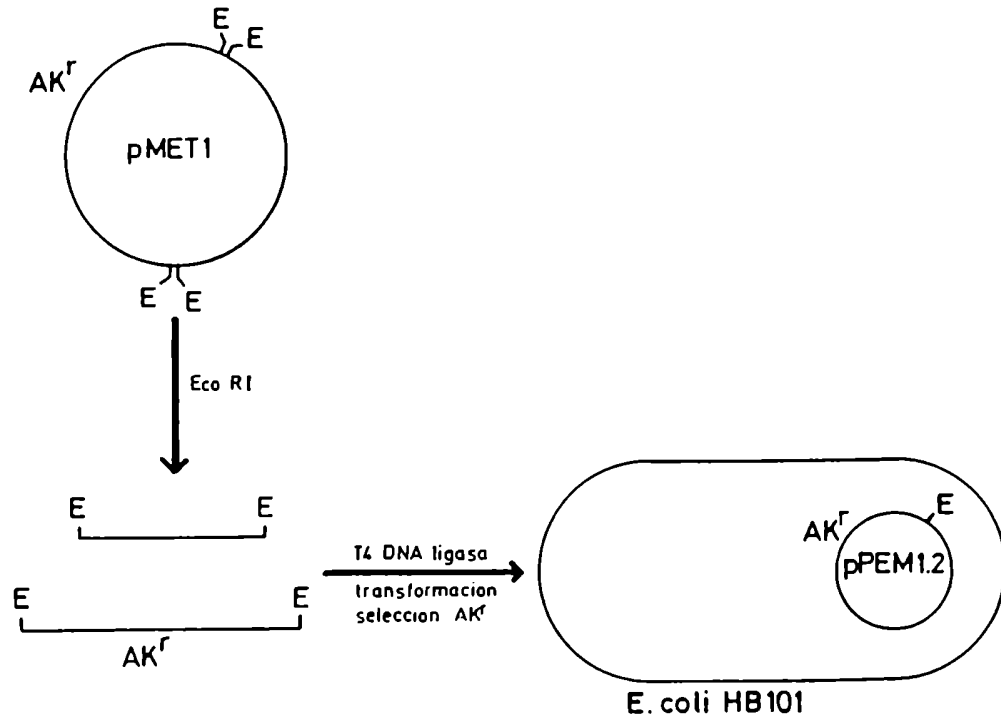


Figura 45. Construcción de pPEM1.2. Se digirió pMET1 con EcoRI(E), se religó con T4 DNA ligasa y se transformó *E. coli* HB101 con el producto de este tratamiento. Por selección de transformantes con Ak se obtuvo *E. coli* HB101 (pPEM1.2). pPEM1.2 carece de un fragmento EcoRI de 20,5kbp presente en pMET1. E simboliza EcoRI.

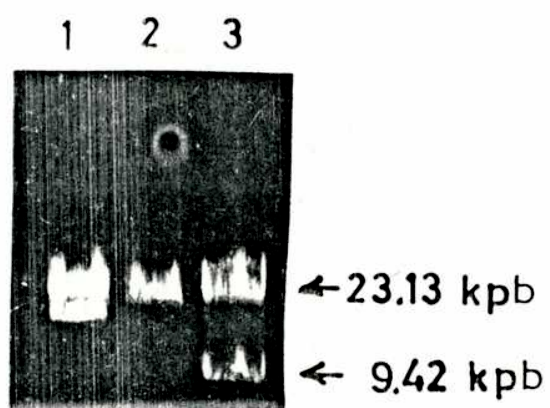


Figura 46. Estructura de pPEM1.2. EGA de digestión con EcoRI de: línea 1, pMET1; línea 2, pPEM1.2. La línea 3 es λ -HindIII.

Tabla XIII. pPEM1.2 es un plásmido movilizable.

cepas conjugadas	crecimiento en	
	Nal-Ak	Nal-Tc
<i>E. coli</i> HB101 (pVK102) x <i>E. coli</i> C2110 x <i>E. coli</i> HB101 (pRK2013)	NA	+
<i>E. coli</i> HB101 (pPEM1.2) x <i>E. coli</i> C2110 x <i>E. coli</i> HB101 (pRK2013)	+	NA

E. coli HB101 (pRK2013) fue usada como "helper" en conjugaciones triparentales entre las cepas mencionadas. Las conjugaciones transcurrieron durante 16 horas a 37°C en medio sólido, seleccionando luego transconjugantes en medio de cultivo conteniendo los antibióticos indicados en cada caso. La cepa recipiente *E. coli* C2110 es *polA gyrA*.

NA = no aplicable

+ = se obtienen colonias de transconjugantes al aplicar esta selección

Un plásmido aceptor de transposición óptimo para la estrategia diseñada debe cumplir varios requisitos. No contendría secuencias de Tn3 que lo rindieran inmune a la transposición. Sería sensible a algún antibiótico al cual el transposón confiere resistencia, permitiendo así seleccionar para el transposón. Codificaría para resistencia a algún antibiótico distinto de aquellos a los que el transposón confiere resistencia, a fin de poder seleccionar su presencia y sería conjugativo.

Si dispusiéramos de un plásmido que cumpliera con todas estas condiciones podríamos emplear pPEM1.2 para experimentos de transposición, ya que en ausencia de pRK2013 podría transferirse el plásmido aceptor o el plásmido aceptor con una inserción del hipotético transposón, sin que pPEM1.2 fuera movilizado. Dado que no disponíamos de este plásmido ideal optamos por utilizar como aceptor pVK102, que cumple todas las condiciones mencionadas a excepción de ser no conjugativo, movilizable por pRK2013. Como pVK102 y pPEM1.2 presentan características similares en cuanto a su movilización en experimentos de conjugación no es posible transferir el plásmido aceptor de transposición, pVK102, en condiciones en que pPEM1.2 no sea también movilizable. Se hizo necesario entonces modificar pPEM1.2 a fin de poder distinguir la presencia en una célula de este plásmido entero de la del transposón que hipotéticamente contiene. Como todas las determinantes genéticas para resistencia a antibióticos contenidas en pPEM1.2 se encuentran contenidas en zonas incluidas en el hipotético transposón, se construyó un derivado de pPEM1.2 que codifica para resistencia a Cm en una región no contenida en el putativo transposón. Con este fin se insertaron secuencias *cat* provenientes de pJHCA18 en pPEM1.2. Para ello se digirieron ambos plásmidos con **HindIII** y **EcoRI**, se ligó con T4 DNA ligasa y con el producto se transformó *E. coli* HB101, seleccionando por resistencia a Cm y a Ak (Fig. 47).

Se obtuvo así un plásmido, pPEM10, formado por pPEM1.2 prácticamente completo con una inserción de un fragmento de pJHCA18, según se comprobó por digestión doble de pPEM10 con **HindIII** y **EcoRI** (Fig. 48). pPEM10 conserva la característica de pPEM1.2 de ser no conjugativo, movilizable; y contiene un marcador adicional de resistencia a Cm, en una zona alejada de las secuencias presuntamente transponibles.

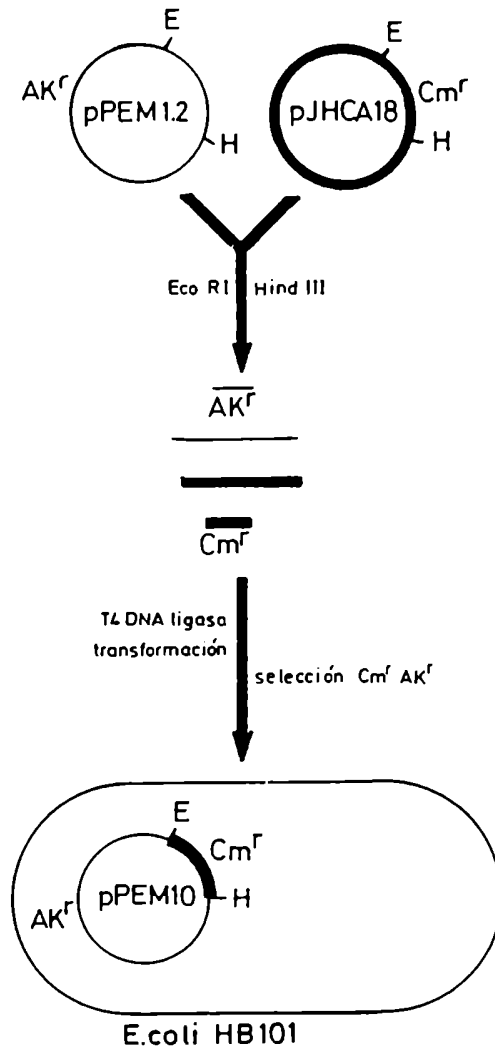


Figura 47. Esquema de la construcción de pPEM10. pPEM1.2 y pJHCA18 se digirieron con *EcoRI*(E) y *HindIII*(H), los productos obtenidos se mezclaron y se trataron con T4 DNA ligasa. Con la mezcla obtenida se transformó *E. coli* HB101, seleccionando para resistencia a Ak y Cm. Resultó *E. coli* HB101 conteniendo el plásmido pPEM10.

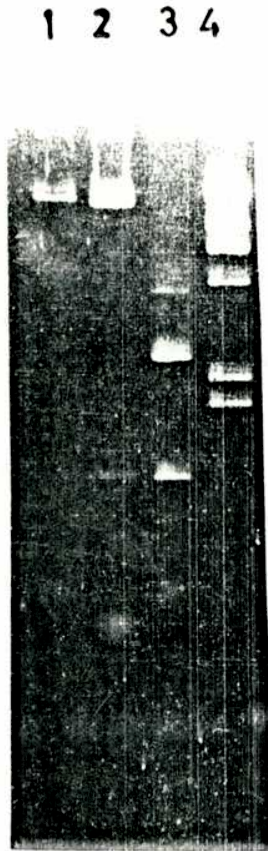


Figura 48. Estructura de pPEM10. EGA de digestión con EcoRI de: línea 1, pPEM1.2; línea 2, pPEM10; línea 3, pJHCA18. La línea 4 es λ -HindIII.

pVK102 confiere resistencia a Tc y no a Cm. pPEM10 confiere resistencia a Ap, Cm y a los AGs Ak, Km, Sm y Tm, pero no a Tc. Esto permite detectar la presencia de cada uno de estos plásmidos o de los dos en una misma célula, por los distintos patrones de resistencia a antibióticos que confieren (Fig. 49).

Con el fin de aislar secuencias transponibles se realizaron experimentos consistentes en conjugaciones triparentales entre *E. coli* HB101 (pVK102,pPEM10), *E. coli* C2110 y *E. coli* HB101 (pRK2013). *E. coli* HB101 (pRK2013) provee las funciones *tra* indispensables para la movilización de pVK102. Las transconjugantes fueron seleccionadas por resistencia a Nal para las células receptoras, Tc para pVK102 y Ak para el transposón.

Las colonias obtenidas podrían corresponder a *E. coli* C2110 conteniendo pVK102 con una inserción del transposón, o ambos plásmidos, o bien el cointegrado formado por ambos plásmidos si la resolución hubiera sido ineficiente. Puede distinguirse fácilmente entre la primera opción y las otras dos analizando la capacidad de las células de crecer en presencia de Cm (Fig. 49).

Utilizando un tiempo de conjugación de 8 o 12 horas todas las colonias obtenidas resultaban resistentes a Cm (Tabla XIV). Por lo tanto eran portadoras de pPEM10 y pVK102, o de un cointegrado formado por ambos.

En cambio cuando las células se dejaban en contacto solamente durante 4 horas previo a la selección, se obtenían colonias sensibles a Cm (Tabla XIV). Esto indicaba la presencia en estas células de pVK102 con una inserción que confiere resistencia a Ak.

Tabla XIV. Conjugación entre *E. coli* HB101 (pVK102,pPEM10), *E. coli* C2110 y *E. coli* HB101 (pRK2013).

tiempo de conjugación (horas)	colonias Nal ^r ,Tc ^r ,Ak ^r ,Cm ^r	colonias Nal ^r ,Tc ^r ,Ak ^r ,Cm ^s
12	100%	0%
4	12%	88%

Se efectuaron conjugaciones entre estas tres cepas, en medio sólido, durante distintos períodos de tiempo. Las transconjugantes obtenidas por resistencia a Nal, Tc y Ak fueron transferidas a medio de cultivo conteniendo Cm a fin de diferenciar aquellas que contenían pPEM10 (Cm^r) de las que no lo portaban (Cm^s).

El análisis de los plásmidos contenidos por distintas colonias sensibles a Cm mostró que se trata de pVK102 con una inserción de 11 kpb, ubicada en distintos sitios de pVK102 en cada caso. Esta inserción corresponde a secuencias de pMET1 que incluyen *mpA*, *mpR*, *bla*, y el fragmento de 3 kpb que contiene *aac* y *aad*, duplicado. La inserción de fragmentos de ADN en diferentes ubicaciones es una característica de los transposones de la familia Tn3, que carecen de especificidad por el sitio de inserción. La ausencia de secuencias de pPEM10 indica que los dos pasos de la transposición mediados por transposasa (transposición) y resolvasa (resolución del cointegrado) tuvieron lugar. La secuencia transponible se denominó Tn1331.2 por su gran semejanza con Tn1331.

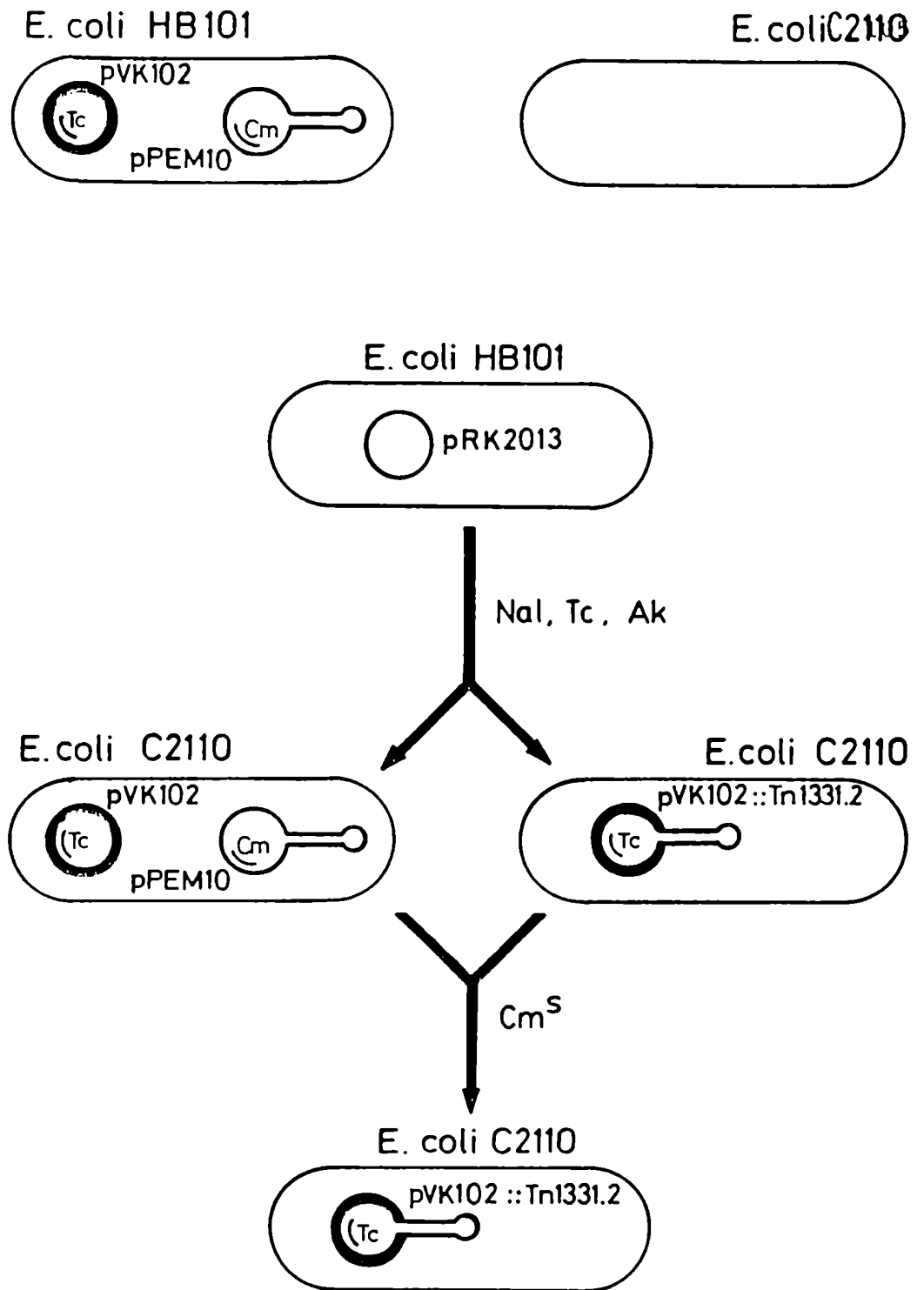


Figura 49. Transposición de Tn1331.2. Se efectuó una conjugación triparental entre *E. coli* HB101 (pPEM10,pVK102); *E. coli* HB101 (pRK2013) y *E. coli* C2110. Las transconjugantes se seleccionaron por Nal^r (*E. coli* C2110), Tc^r (pVK102) y Ak^r (transposón). Las colonias obtenidas se transfirieron a medio de cultivo conteniendo Cm. Las células Cm^r contenían pPEM10 y pVK102; las Cm^s, pVK102::Tn1331.2.

Se comprobó que la obtención de cepas Cm^r para experimentos de conjugación a tiempos largos se debe a la transferencia de ambos plásmidos, pPEM10 y pVK102.

pVK102::*Tn1331.2* y pVK102::*Tn1331* se compararon por digestión con **BstEII** y electroforesis de los fragmentos obtenidos. La elección de esta endonucleasa se debió a que produce una serie de fragmentos a partir de *Tn1331* que forman un perfil característico al separarlos por electroforesis en geles de agarosa. La figura 50-a muestra que los fragmentos de ADN obtenidos para pVK102::*Tn1331.2* y pVK102::*Tn1331* son indistinguibles. Estos fragmentos fueron transferidos a papel de nitrocelulosa y sometidos a hibridación. La sonda empleada corresponde a secuencias de *Tn1331*. Los resultados muestran homología para todos los fragmentos internos del transposón, que dan el perfil característico por digestión con **BstEII**, y para otros dos fragmentos de tamaño variable (Fig. 50-b), marcados 1 y 2.

Teóricamente *Tn1331.2* puede insertarse en cualquier sitio dentro de pVK102. Al hacerlo determina la distancia entre el extremo del transposón y el sitio de restricción **BstEII** de pVK102 mas próximo en cada uno de los sentidos. De tal forma, los fragmentos comprendidos entre los extremos de *Tn1331.2* y sus sitios **BstEII** mas próximos dentro del transposón, que presentan un tamaño fijo, se unen en cada ocasión a secuencias mas o menos cercanas a sitios **BstEII** de pVK102, y por lo tanto, de tamaño diferente en cada evento. Esto determina dos fragmentos **BstEII** (llamados 1 y 2 en la figura 50-b) cuyo tamaño varía para distintos eventos de transposición. Estos fragmentos presentan homología con *Tn1331*, por comprender las regiones mas extremas de *Tn1331.2*.

En las figuras 50-a y 50-b se observa que los resultados obtenidos para pVK102::*Tn1331* y pVK102::*Tn1331.2* por digestión con **BstEII** fueron idénticos. Ambos plásmidos se sometieron a digestión con **SstI**, para la cual existe un sitio dentro del fragmento de 3 kpb duplicado en pMET1. Por electroforesis de los productos obtenidos (Fig. 51-a) se observa la presencia de un fragmento de 3 kpb para cada uno de los pVK102::*Tn1331.2* empleados, que no se encuentra en pVK102::*Tn1331*, indicando que el primero conserva la duplicación presente originalmente en pMET1 (Fig. 51-b).

La figura 52 muestra un diagrama de *Tn1331.2*, en el que se indican los genes que contiene. Se representan las tres regiones de ADN homólogas a *mpR* de *Tn3* presentes en pMET1. No hemos determinado si todas ellas o solamente algunas son funcionales.

IV-9. Complementación de transposasas de *Tn3* y *Tn1331*.

En secciones anteriores se ha demostrado que existe homología entre los genes *mpA*, *bla* y *mpR* presentes en *Tn3*, *Tn1331* y *Tn1331.2*, y que la ubicación relativa de estos genes es similar en los tres casos (sección IV-7.2.). Podría suponerse entonces que *Tn3* sufrió la inserción de un fragmento de ADN de 3 kpb, que contiene los genes *aac* y *aad*, generando *Tn1331* (Fig. 53). A su vez, *Tn1331* habría sufrido amplificación de ese mismo fragmento, originando *Tn1331.2* (Fig. 53).

Un criterio que permitiría confirmar esta vía evolutiva es la complementación de transposasas. La enzima transposasa de *Tn3* es altamente específica, a tal punto que solamente reconoce sus propias IR. Por el contrario, a pesar que las IR de *Tn1000* presentan homología de 27/38 pb (149) con las de *Tn3*, las transposasas codificadas por estos transposones no son capaces de complementar transposición efectiva del otro (84). Se diseñaron entonces experimentos tendientes a establecer si las transposasas de *Tn3* y *Tn1331*, que son altamente homólogas, son

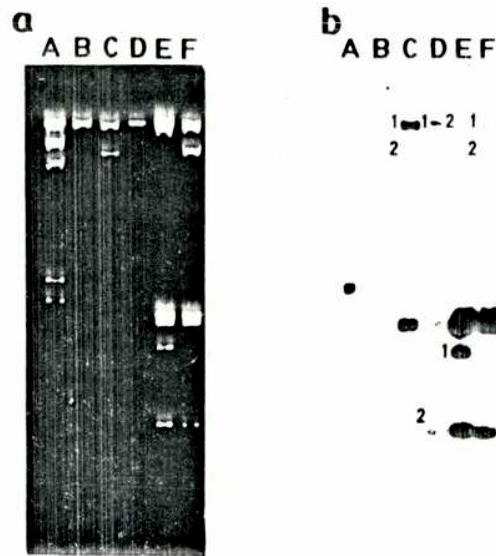


Figura 50. Comparación de *Tn1331* con *Tn1331.2*. **a-** EGA de digestión con *Bst*EII de : carril **B**, pVK102; carril **C**, pVK102::*Tn1331* y carriles **D-F**, diferentes pVK102::*Tn1331.2*. El carril **A** es λ -*Hind*III. **b-** Autorradiografía de hibridación entre los fragmentos del gel **a** y una sonda radiactiva que comprende *Tn1331*. Los fragmentos de tamaño variable formados por los extremos del transposón y secuencias de pVK102 que van desde el lugar de inserción al sitio *Bst*EII mas próximo, se indican **1** y **2**.

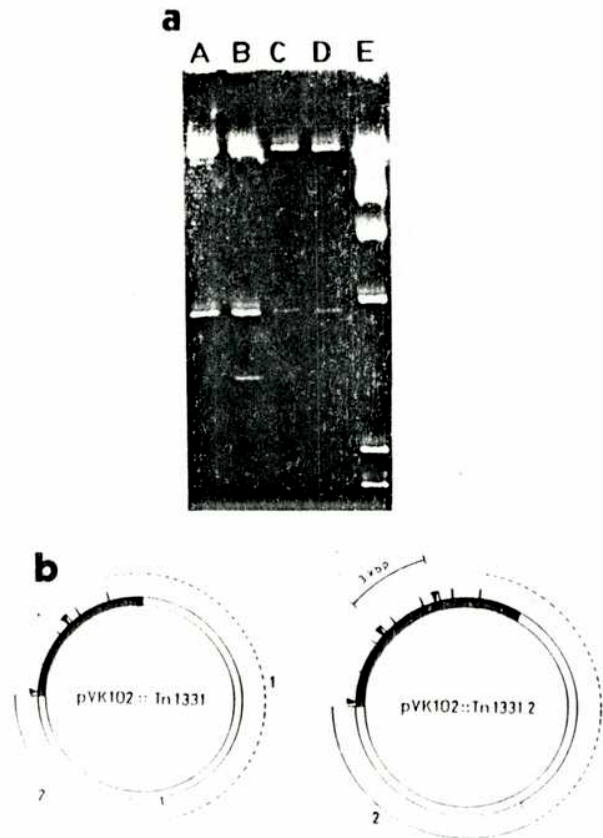


Figura 51. Existencia de una duplicación en tandem en *Tn1331.2*. **a-** EGA de digestión con *SstI* de: **A**, pVK102::*Tn1331*; **B-D**, pVK102::*Tn1331.2*. La línea **E** es λ -*HindIII*. **b-** Esquema de pVK102::*Tn1331* y pVK102::*Tn1331.2*. Se indican los sitios de restricción de *BstEII* contenidos en los transposones con **L** y los de *SstI* con **V**. Las barras negras corresponden a los transposones.



Figura 52. Diagrama de Tn1331.2. Diagrama de Tn1331.2 indicando *tnpA*, *bla*, *aac*, *aad*, y sus tres regiones homólogas a *tnpR* (R).

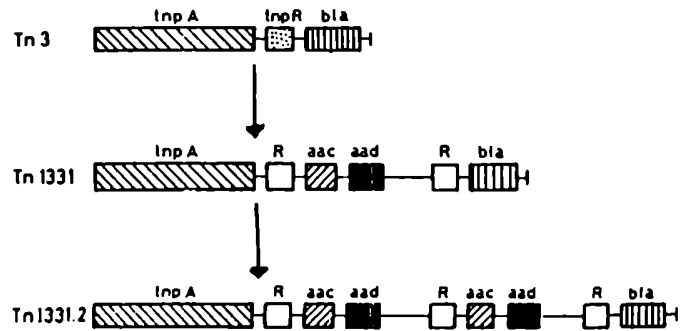


Figura 53. Diagrama de la evolución de Tn3 a Tn1331.2. Esquema del proceso evolutivo que probablemente originó Tn1331.2. Tn3 da origen a Tn1331 por incorporación de un fragmento de ADN de 3 kpb que incluye al gen *aac*, Tn1331.2 surge por duplicación de ese fragmento.

intercomplementables. De serlo quedaría confirmada una relación suficientemente estrecha entre estas transposones como para afirmar que el primer paso del camino evolutivo propuesto ha ocurrido en la naturaleza.

Al realizar experimentos de complementación, la capacidad para transponer en cada caso fue determinada por la frecuencia de transposición a pVK102. Para ello se introdujeron el plásmido portador del transposón y pVK102 en *E. coli* HB101, en cuyo interior ocurriría la transposición. Luego se transfirió el plásmido pVK102, solo o conteniendo el transposón; a *E. coli* C2110. La transferencia fue por conjugación triparental en presencia de *E. coli* HB101 (pRK2013), que actúa como movilizador de pVK102. Los productos de la conjugación fueron seleccionados en dos medios de cultivo diferentes.

Uno de ellos contenía NaI para seleccionar la cepa receptora y Tc para pVK102. En éste crecerían colonias de *E. coli* C2110 conteniendo pVK102 o pVK102 con la inserción de un transposón en los casos en que la transposición halla sido efectiva. El otro medio contenía además de los antibióticos mencionados, uno que se utilizaba como marcador del transposón en cuestión, de forma tal que solamente crecerían en él las bacterias receptoras que hubieran adquirido pVK102 con el transposón insertado. La frecuencia de transposición resultaría entonces de la relación entre el recuento de colonias crecidas en cada medio de cultivo.

$$\text{frecuencia de transposición} = \frac{n^{\circ} \text{ colonias NaI}^{\text{I}} \text{ Tc}^{\text{I}} \text{ X}^{\text{I}}}{n^{\circ} \text{ colonias NaI}^{\text{I}} \text{ Tc}^{\text{I}}}$$

X representa a algún antibiótico al cual el transposón de que se trate confiere resistencia.

Para ensayar complementación entre transposasa de Tn1331 y Tn3 se utilizó una mutante de Tn3 deficiente en la producción de transposasa, Tn3 511, complementándola con el producto de Tn1331. Tn3 511 se encuentra en un derivado deleciónado del plásmido RSF1050 llamado RSF1050 511, que carece de un fragmento del gen *mpA* (84). La inhabilidad de Tn3 511 para transponer se corroboró determinando su frecuencia de transposición (Tabla XV)

Para establecer si la transposasa producida por Tn1331 puede complementar a Tn3 511 se requería un derivado de Tn1331 deficiente en transposición, que mantuviera su gen *mpA* intacto. Tal derivado se obtuvo por digestión parcial de pJHCMW1 con la endonucleasa *HincII* y ligado de los fragmentos obtenidos por la acción de T4 DNA ligasa. El producto de este tratamiento se introdujo en *E. coli* HB101 por transformación, seleccionando por resistencia a Ak. Las colonias Ak^r que además resultaban sensibles a Ap contenían un plásmido llamado pMET14 (Fig. 43). Este se diferencia de pJHCMW1 en que carece de un pequeño fragmento *HincII* (Fig. 54). El fragmento deleciónado contenía un extremo de Tn1331, indispensable para su transposición, y una porción de su gen *bla*, rindiéndolo Ap^s.

La frecuencia de transposición de secuencias de ADN resistentes a Ak desde pMET14 a pVK102 (Tabla XV) demuestra que el derivado de Tn1331 contenido en pMET14 es deficiente en transposición; ya que adopta un valor inferior en cinco órdenes a la frecuencia de transposición de Tn1331 intacto, a partir de pJHCMW1. En la determinación de esta última el AB empleado también fue Ak.

La frecuencia de transposición de Tn3 511 a pVK102 en presencia de pMET14 se estableció utilizando *E. coli* HB101 (pVK102, pMET14, RSF1050 511) como cepa de partida para la conjugación a partir de la cual se obtienen los

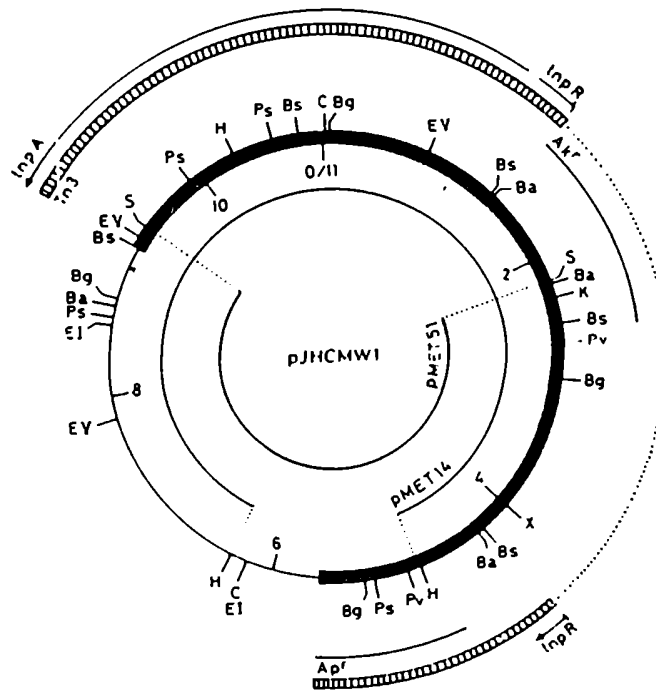


Figura 54. Mapa físico y genético de pJHCMW1, pMET14 y pMET51. Se indican los sitios para: Ba, BamHI; Bg, BglI; Bs, BstEII; C, ClaI; EI, EcoRI; EV, EcoRV; H, HincII; K, KpnI; Ps, PstI; Pv, PvuI; X, XhoI y S, SstI. Las coordenadas se dan en kbp respecto a uno de los sitios ClaI. La barra rayada indica secuencias idénticas a Tn3. La barra negra es Tn1331. En el interior de pJHCMW1 se muestran las secuencias que componen sus derivados por delección: pMET14 y pMET51. Las líneas de puntos indican los sitios en que comienza y termina cada plásmido.

recuentos de colonias. En este caso la frecuencia aumentó en cinco órdenes con respecto a la transposición de Tn3 511 sin complementar (Tabla XV). Esto implica que la transposasa codificada por pMET14, y por lo tanto por Tn1331, es capaz de complementar a Tn3 Δ 511 para su transposición.

Tabla XV. Complementación de mutantes deficientes en transposición.

Plásmidos	Frecuencia de Transposición
pVK102, pJHCMW1	2×10^{-4}
pVK102, pMET14	10^{-9}
pVK102, RSF1050 Δ 511	5×10^{-9}
pVK102, RSF1050 Δ 511, pMET14	6×10^{-9}
pVK102, pMET51	10^{-9}
pVK102, pSshe	10^{-9}
pVK102, pMET51, pSshe	4×10^{-5}

Se conjugó *E. coli* HB101 conteniendo los plásmidos indicados con *E. coli* HB101 (pRK2013) y *E. coli* C2110 como cepa aceptora.

La frecuencia de transposición desde pJHCMW1 y pMET14 se obtuvo como la relación entre el número de colonias Nal^r , Tc^r , Ak^r y la cantidad de colonias Nal^r , Tc^r obtenidas como fruto de la conjugación. Nal^r es marcador de *E. coli* C2110, Tc^r de pVK102 y Ak^r del transposón.

Para Tn3 Δ 511 o Tn1331 Δ s la frecuencia de transposición fue la relación entre el número de colonias Nal^r , Tc^r , Ap^r (que son las que contienen pVK102::Tn3 o pVK102::Tn1331 Δ s) y la cantidad de transconjugantes Nal^r , Tc^r (que indica la cantidad de células *E. coli* C2110 que recibieron pVK102 con o sin transposón insertado durante la conjugación).

A fin de establecer si la transposasa codificada por Tn3 puede a su vez complementar a un derivado de Tn1331 deficiente en esta enzima se utilizaron los plásmidos pMET51 y pSshe. El plásmido pMET51 (Fig. 54) fue generado a partir de pJHCMW1 por digestión con SstI, religación y transformación en *E. coli* HB101, seleccionando para resistencia a Ap y sensibilidad a Ak (Fig. 55). Este plásmido contiene un derivado de Tn1331 que conserva las repeticiones invertidas del transposón, pero presenta una delección en su gen *mpA* (Fig. 54), que se denominó Tn1331 Δ s. La frecuencia de transposición de Tn1331 Δ s contenido en pMET51 a pVK102 fue determinada utilizando Ap como marcador de transposón, y resultó menor de 10^{-9} (Tabla XV), demostrando que Tn1331 Δ s perdió la capacidad de transponer.

pSshe es un plásmido recombinante que contiene el gen *mpA* de Tn3 (165). La Tabla XV muestra que como es de esperar, en este plásmido no hay ninguna secuencia capaz de transponer a pVK102. Sin embargo, en presencia de pSshe la frecuencia de transposición de Tn1331 Δ s, contenido en pMET51, a pVK102 alcanza un valor mayor en cuatro órdenes al que se obtiene en su ausencia (Tabla XV). Esto significa que la transposasa codificada por el gen *mpA* de Tn3 puede ser utilizada eficientemente por Tn1331 Δ s.

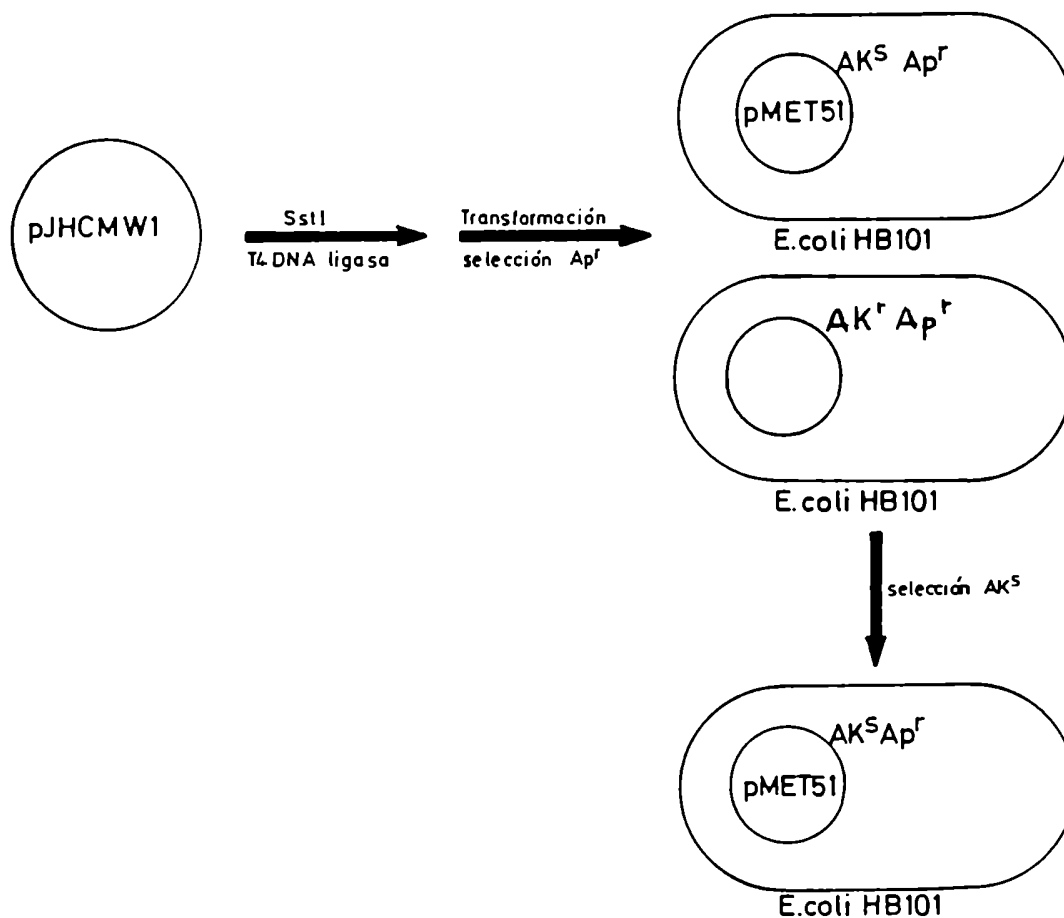


Figura 55. Construcción de pMET51. Se digirió pJHCMW1 con SstI, luego de ligar mediante T4 DNA ligasa, los productos se introdujeron en *E. coli* HB101 por transformación. La selección fue por resistencia a Ap. Las colonias de transformantes se transfirieron a medio de cultivo conteniendo Ak, escogiendo las que fueran Ak^S.

La capacidad de la transposasa codificada por Tn3 de promover transposición de Tn1331 y viceversa indica que Tn1331 y, por analogía Tn1331.2, no solo pertenecen al subgrupo Tn3 de transposones de la familia Tn3, sino que se encuentran muy estrechamente relacionados a Tn3, mucho más que Tn1000, el otro transposón perteneciente a este subgrupo. Esto indica que Tn1331 es un producto de evolución de Tn3 por adición de un fragmento de ADN, que codifica resistencia a AGs. La incorporación a transposones de secuencias responsables de resistencia a ABs ha sido descrita anteriormente para transposones del grupo Tn3, subgrupo Tn21 (113, 137), pero este es el primer caso reportado de una adición de secuencias a Tn3. En el caso de Tn21 se han identificado sitios de alta frecuencia de recombinación ubicados 5' y 3' de su gen *aadA*, comprobándose que en la naturaleza se han generado nuevos transposones por recombinación en esos puntos (137). La secuenciación de parte de Tn1331 (130) permitió detectar las mismas secuencias de alta frecuencia de recombinación en este transposón a ambos lados de su gen *aac*, una de ellas relacionada con su gen *aadA*. Esto constituye una fuerte evidencia que la relación evolutiva entre Tn3 y Tn1331 es la misma que entre Tn21 y transposones derivados de él por incorporación de secuencias en puntos de alta frecuencia de recombinación.

IV-10. Amplificación.

Al realizar experiencias con cepas bacterianas que contenían pMET1 en varias ocasiones se obtuvo espontáneamente un derivado de este plásmido, llamado pMET1_d, que carece de una de las copias del fragmento **Bam**HI de 3 kpb duplicado, según se demostró por mapeo de restricción (Fig. 56). De la misma manera cepas conteniendo pMET1_d originaron pMET1, en condiciones de cultivo indistinguibles de aquellas para las cuales pMET1_d permanecía inalterado.

Se han descrito numerosos casos en que se obtuvieron derivados de plásmidos que llevaban amplificada una zona conteniendo determinantes genéticos para resistencia a distintos antibióticos. El método empleado para obtenerlos era inoculación sucesiva de células que portaban esos plásmidos en medio de cultivo con concentraciones crecientes del antibiótico en cuestión (114, 123, 145, 189). Estos derivados amplificados eran capaces de producir nuevamente el plásmido de origen al cultivarlos en ausencia de altas concentraciones de antibiótico que proveyeran una alta presión de selección para la forma amplificada. Este proceso se denominó transición inversa.

La amplificación génica o transición es un fenómeno que ocurre habitualmente con baja frecuencia. Puede ser seleccionado aplicando una presión de selección adecuada. Entonces resulta lógico suponer que pMET1, que contiene una duplicación "en tandem" de un fragmento de ADN portador de los genes responsables de conferir resistencia a AGs, y es capaz de perder y recuperar esa duplicación espontáneamente (Fig. 57), pueda haberse generado a partir de un plásmido idéntico a él pero conteniendo una sola copia de ese fragmento. Las células portadoras de pMET1 podrían haberse visto favorecidas con respecto a aquellas conteniendo una sola copia de ese gen de resistencia a Ak, en pacientes que recibieran tratamiento con Ak, Km o Tm (Fig. 57).

Las interconversiones entre pMET1 y pMET1_d en el laboratorio no pudieron relacionarse con variaciones en la concentración o la naturaleza del AB utilizado para el cultivo. Tampoco con la ausencia de algunos antibióticos en el medio de cultivo; ni con el genotipo de la cepa en la que se encontraba el plásmido (*recA*⁻ o *recA*⁺, *polA*⁻ o *polA*⁺).



Figura 56. Comparación entre pMET1 y pMET1_d. EGA de digestión con XhoI de: carril 1, pMET1; carril 2, pMET1_d. El carril 3 es λ -HindIII. El fragmento de 3 kbp presente en el carril 1, no se observa en el carril 2.

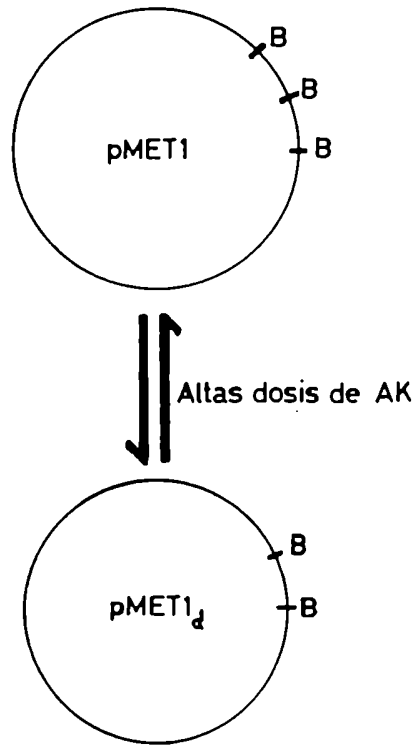


Figura 57. Interconversión entre pMET1 y pMET1_d.

Un caso bastante particular se presentó para un derivado de pMET1, pPEM1.2 (Fig. 58). Este está formado únicamente por el fragmento de 27,5 kpb comprendido entre sitios *EcoRI* en pMET1. Durante el transcurso de un experimento en el que se empleaba *E. coli* HB101 (pPEM1.2) se obtuvieron a partir de ella tres cepas distintas. Los plásmidos contenidos en estas cepas eran pPEM1, pPEM1.2 y pPEM1.3; donde pPEM1.2 es el plásmido de partida, sin alteraciones. Al analizar estos plásmidos, resultaron interesantes los resultados obtenidos por digestión de los mismos con *PstI* (Fig. 59-a). Uno de los fragmentos formados presenta un tamaño diferente para cada uno de los tres plásmidos. De acuerdo al mapa físico de pPEM1.2 (Fig. 58) este fragmento es el que incluye la duplicación "en tandem", proveniente de pMET1. A fin de establecer con precisión cuales de los fragmentos formados por acción de *PstI* son los portadores del gen que codifica para resistencia a Ak, se hibridaron las bandas de ADN transferidas a papel de nitrocelulosa con una sonda formada por el fragmento *BamHI* de 3 kpb de pJHCMW1, marcado con (^{32}P) α -ATP. La figura 59-b muestra que el fragmento que lleva las determinantes genéticas para resistencia a Ak mide 5,7 kpb para pPEM1, 8,7 kpb para pPEM1.2 y 14,7 kpb para pPEM1.3. Esto corresponde a la presencia de una copia del fragmento de 3 kpb portador del gen para Ak^r en pPEM1, dos en pPEM1.2 y cuatro en pPEM1.3. Por lo tanto los resultados demuestran que en un mismo experimento, en condiciones idénticas, se produjo transición, transición inversa y ningún efecto sobre pPEM1.2.

Se deseaba determinar si el mayor número de copias del gen responsable de resistencia a Ak está relacionado con resistencia a concentraciones mayores del aminoglicósido. Para ello se midió actividad de AAC(6') en extractos preparados por SO a partir de *E. coli* HB101 conteniendo pPEM1, pPEM1.2 y pPEM1.3.

Los valores obtenidos (Tabla XVI) muestran que no se puede detectar diferencia entre las actividades específicas de AAC(6') contenidas en cepas portadoras de plásmidos que llevan una o dos copias del gen *aac*. Sin embargo, cuando el plásmido contiene cuatro copias del mismo gen, la actividad específica de la enzima es significativamente mayor que la obtenida en los otros dos casos. Esto indica que existe una relación entre el número de copias del gen *aac* y la cantidad de enzima inactivadora producida, la cual determina el grado de resistencia conferido. Otra conclusión que puede extraerse de este experimento es que las nuevas copias del gen *aac*, obtenidas por amplificación, también se expresan.

Tabla XVI. Actividad de AAC(6') en extractos de *E. coli* conteniendo pPEM1, pPEM1.2 y pPEM1.3.

cepas	Actividad específica de AAC(6') (cpm/ μ g prot.)
<i>E. coli</i> HB101 (pPEM1)	380
<i>E. coli</i> HB101 (pPEM1.2)	410
<i>E. coli</i> HB101 (pPEM1.3)	570
<i>E. coli</i> HB101 (pJHCMW1)	1.200

Los extractos empleados fueron preparados por SO a partir de cultivos de las diferentes cepas. La actividad enzimática se determinó por el método del papel de fosfoclulosa, utilizando Ak como sustrato (78). Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry (105).

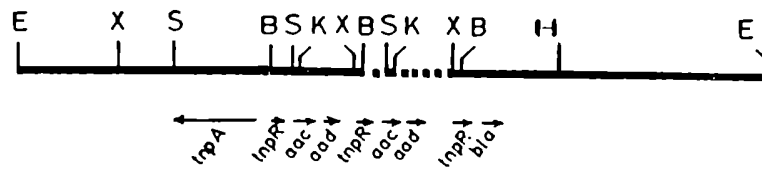


Figura 58. Mapa de restricción de pPEM1.2. Se indican los genes *mpA*, *mpR*, *bla*, *aac* y *aad*. Los sitios de restricción son: B = BamI II; E = EcoRI; H = HindIII; K = KpnI; S = SstI; X = XhoI.

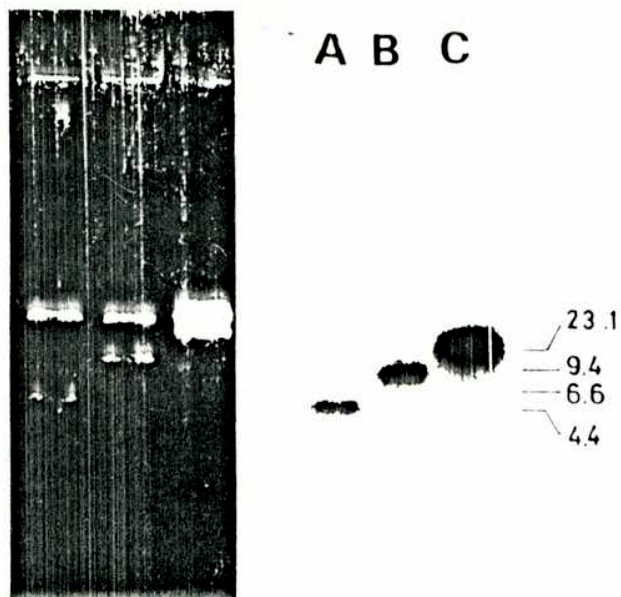


Figura 59. Digestión con *Pst*I de los plásmidos pPEM1, pPEM1.2 y pPEM1.3. **a-** EGA de productos de digestión con *Pst*I de: línea **A**, pPEM1; línea **B**, pPEM1.2, portador de Tn1331.2; línea **C**, pPEM1.3. Se indican los tamaños correspondientes a los marcadores. **b-** Hibridación del gel **a** con una sonda consistente en una región de DNA de Tn1331 que contiene los genes *aac* y *aad*.

No hemos podido establecer las condiciones que favorecen la amplificación del gen para resistencia a aminoglicósidos. Sin embargo hemos mostrado la capacidad de pMET1 y plásmidos derivados de éste para adquirir o perder copias de un fragmento de 3 kpb portador del gen *aac*. Demostramos también que existe relación entre el número de copias de este gen y la concentración de antibiótico que la célula portadora podría resistir, en base a la cantidad de enzima inactivadora que produce. Esto se relaciona también con el hecho que pJICMW1, que presenta una única copia de *aac* sea un plásmido de alto número de copias, mientras que pMET1, que presenta dos copias del mismo gen, se encuentra en las células en bajo número de copias.

Todo esto sostiene la hipótesis que pMET1 podría haberse originado a partir de un precursor idéntico a él en todo salvo la presencia de una copia menos del fragmento de 3 kpb. La presencia de la duplicación podría haberse mantenido debido al uso terapéutico de dosis elevadas de aminoglicósidos, estableciendo condiciones en las que células portadoras de pMET1 tuvieran ventaja para sobrevivir sobre aquellas que contuvieran su plásmido progenitor, pMET1_d (Fig. 57).

V- CONCLUSIONES.

1- Se ha aislado un plásmido, pMET1, de una cepa multirresistente de *K. pneumoniae* proveniente de pacientes de una epidemia ocurrida en la ciudad de Mendoza. Este plásmido es conjugativo, hallándose derreprimido para su transferencia por conjugación, y es portador de determinantes genéticos para resistencia a Ap, Ak, Km, Sm y Tm (sección IV-2. y IV-3.). Estas características son importantes desde el punto de vista epidemiológico, ya que su transferencia a otras cepas constituiría una forma muy veloz de diseminación de múltiples resistencias. De hecho, la transferencia de plásmidos y transposones es la mayor forma de diseminación de resistencia a antibióticos conocida (62).

2- En cuanto a Ak en particular, se ha demostrado que la resistencia a ella (y a Km y Tm) mediada por pMET1 se debe a una enzima AAC, codificada por un gen *aac* que ha sido clonado (sección IV-4.). Esta enzima ha sido parcialmente purificada, y clasificada por su rango de sustratos como una 6'-N-acetiltransferasa (sección IV-5.). Su peso molecular, determinado por transcripción y traducción in vivo e in vitro, es de 26 kD (sección IV-6.).

3- La caracterización de pMET1 determinó que además del gen *aac* contiene genes *mpA*, *mpR* y *bla* homólogos a los del transposón Tn3 (sección IV-7.2.).

4- A partir de pMET1 se aisló el transposón Tn1331.2, portador de determinantes genéticos para resistencia a Ap, Ak, Km, Sm y Tm (sección IV-8.). Tn1331.2 es muy similar a otro transposón, Tn1331, aislado en nuestro laboratorio a partir del plásmido pJHCMW1, proveniente de *K. pneumoniae* de una epidemia en la ciudad de Buenos Aires. La única diferencia entre ambos transposones es la existencia de una duplicación en tandem de un fragmento de 3 kpb que contiene al gen *aac* en Tn1331.2 (secciones IV-7.3. y IV-8.). La amplificación y la pérdida de fragmentos de ADN comprendidos entre secuencias homólogas se producen habitualmente, con baja frecuencia. En el caso de pMET1 hemos encontrado en el laboratorio derivados de él que han perdido o ganado copias del fragmento de 3 kpb que se encuentra duplicado en pMET1 (sección IV-10.). La amplificación de secuencias portadoras de determinantes genéticos para resistencia a antibióticos es una de las formas posibles de aumentar su expresión (62). Es probable que la forma del transposón amplificada en el gen *aac* haya sido seleccionada por el uso de Ak. El hecho que el número de copias de pMET1 es menor que el de pJHCMW1 y que por lo tanto éste produce menor cantidad de AAC (sección IV-5.) podría estar relacionado con la selección de la forma amplificada de transposón en pMET1, por el uso de dosis terapéuticas de Ak.

5- Por comparación entre pMET1 y pJHCMW1 (sección IV-7.3.) se demostró que ambos plásmidos son totalmente diferentes, salvo por los transposones que contienen. Esto implica que la diseminación de resistencias para las cuales codifican no ha ocurrido a través de un plásmido, sino que ha sido mediada por transposones del tipo Tn1331, los cuales se transfieren de un plásmido a otro o al cromosoma, y por medio de plásmidos de una bacteria a otra. Estudios epidemiológicos han demostrado que cepas resistentes a Ak aisladas en diferentes localizaciones en Argentina contienen todos plásmidos con secuencias correspondientes a transposones del tipo de Tn1331, y en algunos casos el fragmento que contiene a *aac* se encuentra duplicado (41).

6- *Tn1331.2* y *Tn1331* son transposones de la familia *Tn3*, ya que contienen genes *tpa* y *tpR* homólogos a los de *Tn3* (secciones IV-7.2.1. y IV-7.2.2.) y dentro de esta familia corresponden al subgrupo de *Tn3*, por la dirección de transcripción de estos genes, deducida de su mapa físico. Los transposones *Tn3* y *Tn1000*, componentes de este subgrupo, codifican transposasas que no son intercomplementables (84), siendo la transposasa de *Tn3* capaz de promover transposición únicamente de este elemento. La transposasa codificada por *Tn1331* es capaz de complementar a *Tn3* para su transposición y viceversa (sección IV-9.), demostrando que *Tn1331* (y *Tn1331.2*) proviene de *Tn3* por inserción de secuencias responsables de resistencia a AGs. Se han descrito situaciones similares para otros transposones, especialmente para *Tn21* (167, 171), para el cual se conocen además sitios de alta frecuencia de inserción de nuevas secuencias (113, 137). Se puede concluir que evolutivamente *Tn1331* proviene de *Tn3* por inserción de un fragmento de ADN de 3 kpb que contiene los genes *aac* (Ak^r , Km^r , Tm^r) y *aad* (Sm^r), y que éste a su vez originó a *Tn1331.2* por amplificación de esas secuencias (sección IV-10., Fig. 53).

7- Los transposones *Tn1331.2* y *Tn1331* son un ejemplo de resistencia a ABs codificada en "bloques". Ellos, al igual que *Tn3*, codifican para resistencia a Ap, pero también a Sm (gen *aad*) y a Ak, Km y Tm (gen *aac*). Esto implica que si en un intento de aumentar la vida media de los antibióticos se evitase usar alguno de éstos (en este caso Ap o AGs) durante años, la utilización de cualquiera de los otros seguiría seleccionando bacterias que contienen *Tn1331* o *Tn1331.2*. Debido a la existencia de este tipo de transposones muchos autores consideran que se ha llegado a un punto sin retorno, a partir del cual no podrá recuperarse la eficacia de los antibióticos existentes, y solo resta encontrar otros nuevos y usarlos concienzudamente.



VI-CITAS

1. Actis, L., M. Roberts and J. Crosa. (1985) *Antimicrob. Agents Chemother.* -28:176-180
2. Adler, H.I., W. D. Fisher, A. Cohen, and A. A. Hardigree. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* -57:321-326
3. Adzuma, K. and K. Mizuuchi. (1988) *Cell* -53:257-266
4. Adzuma, K. and K. Mizuuchi. (1989) *Cell* -57:41-47
5. *Affinity Chromatography-Principles and Methods.* (1979) Pharmacia Fine Chemicals
6. Allmansberger, R., B. Bräu and W. Piepersberg. (1985) *Mol. Gen. Genet.* -198:514-520
7. Anand, N., B. D. Davis and A. K. Armitage. (1960) *Nature* -185:23-24
8. *Antibiotics III* (1975) Ed. J. W. Corcoran y F. E. Hahn
9. Argos, P., A. Landy, K. Abremski, J. B. Egan, I. Haggard-Liungquist, R. H. Hoess, M. I. Kahn, B. Kalionis, S. V. I. Narayana, J. S. Pierson, N. Sternberg and J. Leong. (1986) *EMBO J.* -5:433-440
10. Aronoff, S. C. and J. D. Klinger. (1984) *Antimicrob. Agents Chemother.* -25:279-280
11. Arthur, A., E. Nimmo, S. Hettle and D. Sherratt. (1984) *EMBO J.* -3:1723-1729
12. Auclair, P., C. Lessard and M. G. Bergeron. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:736-739
13. Barg, N. L. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:1834-1838
14. Beauchamp, D. and M. Pettigrew. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:992-996
15. Beauclerk, A. A. D. and E. Cundliffe. (1987) *J. Mol. Biol.* -193:661-671
16. Bender, J. and N. Kleckner. (1986) *Cell* -45:801-815
17. Benjamin, H. W. and N. R. Cozzarelli. (1988) *EMBO J.* -7:1897-1905
18. Betermier, M., R. Alazard, F. Ragueh, E. Roulet, A. Toussaint and M. Chandler. (1987) *Mol. Gen. Genet.* -210:77-85
19. Birge, E. A. and K. B. Low. (1974) *J. Mol. Biol.* -83:447-457
20. Birnboim, H. C. and Doly. (1979) *Nucleic Acid Res.* -7:1513-1523
21. Bolivar, F. (1978) *Gene* -4:121-126
22. Bongaerts, G. P. A. and G. M. P. Kaptijn. (1981) *Antimicrob. Agents Chemother.* -20:344-350
23. Bongaerts, G. P. A. and J. S. Vliegenthart. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:740-746
24. Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix. (1969) *J. Mol. Biol.* -41:459-472

25. Brion, N., J. Barge, I. Godefroy, F. Dromer, C. Dubois, A. Contrepois and C. Carbon (1984) *Antimicrob. Agents Chemother.* -25:168-172
26. Bryan, L. E. (1984) Aminoglycoside Resistance p.241-277 En *Antimicrobial Drug Resistance* Ed. Academic Press Inc. - New York
27. Bryan, L. E. and S. Kwan. (1983) *Antimicrob. Agents Chemother.* -23:835-845
28. Bryan, L. E. and H. M. Van den Elzen. (1977) *Antimicrob. Agents Chemother.* -12:163-177
29. Buesing, M. A. and J. H. Jorgensen (1984) *Antimicrob. Agents Chemother.* -25:283-285
30. Bustamante, C. I., G. L. Drusano, R. C. Wharton and J. C. Wade. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* -31:632-634
31. Cameron, R. K., A. M. Jarjour, P. P. Tolia and M. S. DuBow. (1988) *FEBS Lett.* -2:283-288
32. Clark, R. B., C. J. Sanders, C. B. Pakis and M. K. Hostetter. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:689-692
33. Clewell, D. B., S. E. Flanagan, Y. Ike, J. M. Jones and C. Gawron-Burke. (1988) *J. Bacteriol.* -170:3046-3052
34. Clewell, D. B. and C. Gawron-Burke. (1986) *Ann. Rev. Microbiol.* -40:635-659
35. Col, N. F. and R. W. O'Connor. (1987) *Rev. Infect. Dis.* - 9:S232-S243
36. Couturier, M., F. Bex, P. L. Bergquist and W. K. Maas. (1988) *Microbiol. Rev.* -52:375-395
37. Craigie, R. and K. Mizuuchi (1987) *Cell* -51:493-501
38. Crosby, S. S., W. A. D. Edwards, C. Brennan, E. P. Dellinger and L. A. Bauer. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* -31:850-853
39. Cunha, B. A. (1983) *En Challenges in Empiric Therapy*. Ed. Bristol Labs., Division of Bristol-Myers Company.
40. Curtis, R. III. (1981) Gene Transfer -243-265. En *Manual of Methods for General Bacteriology*. P. Gerhardt, R. Murray, R. Costilon, E. Nester, W. Wood, N. Krieg, and G. Philips (ed). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
41. Chamorro, R.M., L. A. Actis, J. H. Crosa and M. E. Tolmasky. (enviado para su publicación)
42. Chen, L. and P. C. Tai. (1986) *J. Bacteriol.* -167:389-392
43. Chow, A. W., J. Wong and K. H. Bartlett. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:782-784
44. Damper, P. D. and W. Epstein. (1981) *Antimicrob. Agents Chemother.* -20:803-808
45. Davis, B. D. (1987) *Microbiol. Rev.* -51:341-350
46. Davis, B. D., L. Chen and P. C. Tai. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* -83:6164-6168
47. Davies, J. (1986) *ASM News* -52:620-624

48. Davies, J. E. In *Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids*. Ed. S. B. Levy, R. C. Clowers & E. L. Koenig - Plenum Press - New York and London
49. Davies, J. E. (1983) *Rev. Infect. Dis.* -5:S261-S266
50. Davies, J. E. and R. E. Benveniste. (1973) *En Annals New York Acad. of Sciences*.
51. Davies J. and D. I. Smith. (1978) *Ann. Rev. Microbiol.* -32:469-518
52. Debbia, E., A. Pesce and G. C. Schito (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:279-281
53. Dennison, S., and S. Baumberg. (1975) *Mol. Gen. Genet.* -138:323-331
54. Derbyshire, K. M., L. Hwang and N. D. F. Grindley. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* -84:8049-8053
55. Dodd, H. M. and P. M. Bennett. (1987) *J. Gen. Microbiol.* -133:2031-2039
56. Evans, L. R. and N. L. Brown. (1987) *EMBO J.* -9:2849-2853
57. Falcow S. and D. A. Portnoy. (1983) *Clin. & Invest. Med.* -6:207-212
58. Feinberg, A. P. and B. Vogelstein. (1984) *Anal. Biochem.* -137:266-267
59. Fernández, R. O. and D. N. Antón. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* -31:1627-1631
60. Ferreti, J. J., K. S. Gilmore and P. Courvalin. (1986) *J. Bacteriol.* -167:631-638
61. Figurski, D. and D. R. Helinski. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* -76:1648-1662
62. Foster, T. J. (1983) *Microbiol. Rev.* -47:361-409
63. Frazier, D. L. and J. E. Riviere. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* -31:1929-1934
64. Freire Bastos, M. C. de and E. Murphy. (1988) *EMBO J.* -7:2935-2941
65. García Patronc, M. (1985) *Mol. Cell. Biochem.* -68:131-137
66. García-Riestra, C., M. H. Perlin and S. A. Lerner. (1985) *Antimicrob. Agents Chemother.* -27:114-119
67. Gates, C. A. and D. B. Northrop. (1988) *Biochemistry.* -27:3820-3825
68. Genilloud, O., J. Blázquez, P. Mazodier and F. Moreno. (1988) *J. Bacteriol.* -170:1275-1278
69. Gerding, D. N., T. A. Larson (1986) *Am. J. Med.* -80:139-147
70. Giamarellou, H. and G. Petrikkos. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* -31:959-961
71. Gilbert, V. E., J. D. Beals, S. E. Natelson and W. A. Tyler (1986) *Neurosurgery* -18:402-406
72. Goto, N., A. Mochizuki, Y. Inagaki, S. Horiuchi, T. Tanaka and R. Nakaya. (1987) *J. Bacteriol.* -169:4388-4390

73. Grindley, N. D. F. (1983) *Cell* -32:3-5
74. Grindley, N. D. F., B. J. Newman, L. A. Wiater and E. E. Falvey (1985) *En Genome Rearrangement*. Ed. Alan R. Liss, Inc.
75. Grindley, N. D. and R. R. Reed. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* -54:863-896
76. Guglielmo, B. J., J. F. Flaherty, T. M. Woods, G. La Follette, and J. G. Gambertoglio. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* -31:264-266
77. Guiney, D. G. and D. H. Helinski. (1979) *Mol. Gen Genet.* -176:183-189
78. Haas, M. J. and J. E. Dowding (1975) *Methods Enzymol.* -48:611-628
79. Hancock, R. E. W. (1984) *Ann. Rev. Microbiol.* -38:237-264
80. Hancock, R. E. W., V. J. Raffle and T. I. Nicas. (1981) *Antimicrob. Agents Chemother.* -19:777-785
81. Hathorn, J. W., M. Rubin and P. A. Pizzo. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* -31:971-977
82. Hayashi, T., Y. Watanabe, K. Kumano, R. Kitayama, T. Yasuda, I. Saikawa, J. Katahira, T. Kumada and K. Shimizu. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:912-918
83. Heffron, F. (1983) *En Mobil Genetic Elements*. Ed. Academic Press, Inc.
84. Heffron, F., P. Bedinger, J. Champoux and S. Falcow (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* -74:702-706
85. Heffron, F., B. J. McCarthy, H. Ohtsubo, and E. Ohtsubo. (1979) *Cell* -18:1153-1164
86. Herbert, C. J., M. Sarvar, S. S. Ner, J. G. Giles and M. Akhtar. (1986) *Biochem. J.* -233:383-393
87. Ho, J. L. and M. Barza. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* -31:485-491
88. Hwa, V., N. B. Shoemaker and A. A. Salyers (1988) *J. Bacteriol.* -170:449-451
89. Ichikawa, H., K. Ikeda, W. L. Wishart and E. Ohtsubo. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* -84:8220-8224
90. Inderlied, C. B., P. T. Kolonoski, M. Wu and L. S. Young. (1989) *Antimicrob. Agents Chemother.* -33:176-180
91. Jacoby, G. A. (1974) *Antimicrob. Agents Chemother.* -6:807-810
92. John, J. F., Jr., W. F. McNeill, K. E. Price and P. A. Kresel. (1982) *Antimicrob. Agents Chemother.* -21:587-591
93. Jawetz, E., J. B. Gunnison and J. B. Bruff. (1952) *J. Bacteriol.* -64:29-39
94. Kawaguchi, H. (1976) *J. Infect. Dis.* -134:S242-S248
95. Kleckner, N. (1981) *Ann. Rev. Genet.* -15:341-401
96. Knauff, V. and E. Nester. (1982) *Plasmid* -8:45-54

97. Knodel, L. C., B. R. Goldspiel and R. S. Gibbs. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:853-857
98. Kushner, S. R. (1978) *En Usefull Host Strains and Techniques for Recombinant DNA Experiments.* Ed. Neidhardt, F. C. - Washington, D.C.
99. Kusser, W., K. Zimmer and F. Fiedler. (1985) *Eur. J. Biochem.* -151:601-605
100. Lambert, C. M., C. J. Wrighton and P. Strike (1987) *Plasmid* -17:26-36
101. Leong, S., G. S. Ditta and D. Helinski. (1982) *J. Biol. Chem.* -257:8724-8730
102. Levine, J.F., M. J. Maslow, R. E. Leibowitz, A. A. Pollock, B. A. Hanna, S. Schaeffer, M. S. Simberkoff, and J. J. Rahal. (1985) *J. Infect. Dis.* -151:295-300
103. López-Cabrera, M., J. A. Pérez-González, P. Heinzl, W. Piepersberg and A. Jiménez. (1989) *J. Bacteriol.* -171:321-328
104. Lorian, V. (1980) *En Antibiotics in Laboratory Medicine.* Ed. The Williams & Wilkins Company, Baltimore
105. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. (1959) *J. Biol. Chem.* -193:265-275
106. Macrina, F. L., D. J. Kopecko, K. R. Jones, D. J. Ayers and S. M. McCowen. (1978) *Plasmid* -1:417-420
107. Mahillon, J. and D. Lerechus. (1988) *EMBO J.* -7:1515-1525
108. Maniatis, T., E. F. Fritsch, J. Sambrook. (1982) *En Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Ed. Cold Spring Harbor Lab.
109. Mardones, J. (1979) *En Farmacología.* Ed. Editorial Intermédica SAICI- Buenos Aires, Argentina
110. Marini, P. E., R. M. Chamorro, L. A. Actis, A. Petroni and M. E. Tolmasky. (1988) *An. Asoc. Quím. Argent.* -77:177-184
111. Martin, N. L. and T. J. Beveridge. (1986) *Antimicrob. Agents Chemother.* -29:1079-1087
112. Martin, C., R. Gómez-Lus, J. M. Ortiz and J. M. García-Lobo. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* -31:1266-1270
113. Martinez, E. and F. de la Cruz. (1988) *Mol. Gen. Genet.* -211:320-325
114. Mattes, R., H.J. Burkardt and R. Schmitt. (1979) *Mol. Gen. Genet.* -168:173-184
115. Mc Conaughy, B. L., C. D. Laird and B. J. Mc Carthy. *Biochemistry* (1969) *Biochemistry* -8:3289-3295
116. Mc Kown, R. L., K. A. Orle, T. Chen and N. L. Craig. (1988) *J. Bacteriol.* -170:352-358
117. Melancon, P., C. Lemieux and L. Brakier-Gingras. (1988) *Nucleic Acid Res.* -16:9631-9639
118. Merck Sharp and Dohme International. (1981) *En Antibiotics in Historical Perspective.* Ed. David L. Cowen, Alvin B. Segelman - Merck & Co., Inc.- U.S.A.

119. Merlin, T. L., D. L. Corvo, J. H. Gill and J. K. Griffith. (1989) *Antimicrob. Agents Chemother.* - 33:230-232
120. Meunier, F., R. Snoeck, H. Lagast, F. Woussen and J. Klustersky. (1986) *J. Antimicrob. Chemother.* -17(suppl. C):195-201
121. Meyer, R. D., R. P. Lewis, E. D. Carmatt y S. M. Finegold. (1975) *Ann. Inter. Med.* -83:790-800
122. Meyer, J.F., B. A. Nies, and B. Wiedeman. (1983) *J. Bacteriol.* -155:755-560
123. Meyer, Jürg and Shigeru Iida. (1979) *Mol. Gen. Genet.* - 176:209-219
124. Miller, J. H. (1972) *En Experiments in Molecular Genetics*. Ed. Cold Spring Harbor Lab, New York.
125. Mizuuchi, K. and R. Craigie (1986) *Ann. Rev. Genet.* -20:385-429
126. Morita, M., S. Tsunasawa and S. Yoshinobu. (1987) *J. Biochem.* -101:1253-1264
127. Murray, B.E., and R. C. Moellering. (1982) *Ann. Inter. Med.* -96:176-180
128. Nichols, W. W., S. M. Dorrington, M. P. E. Slack and H. L. Walmsley. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:518-523
129. Nikaido, H. and M. Vaara. (1985) *Microbiol. Rev.* -49:1-32
130. Nobuta, K., M.E.Tolmasky, L.M.Crosa and J.H.Crosa. (1988) *J. Bacteriol.* -170:3769-3773
131. Nossal, N.G., and L. H. Fleppel. (1966) *J. Biol. Chem.* -241:3055-3062
132. Oakley, B. R., D. R. Kirsch, N. R. Morris (1980) *Anal. Biochem.* -105:361-363
133. Obbink, D. J. G., L. J. Ritchie, F. H. Cameron, J. S. Mattick and V. P. Ackerman. (1985) *Antimicrob. Agents Chemother.* -28:96-102
134. O'Brien, T. F., D. G. Ross, M. A. Guzman, A. A. Medeiros, R. W. Hedges and D. Botstein (1980) *Antimicrob. Agents Chemother.* -17:537-543
135. Olson, E. R. and S. Chung. (1988) *J. Bacteriol.* -170:1955-1957
136. Otten, Von H. y M. Plembel. (1980) *En Antibióticos Aminoglucósidos*. Ed. Editorial Georg Thieme-Stuttgart e Imprenta La Platense-La Plata, Argentina
137. Oullette, M., L. Bissonnette and P. H. Roy. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* -84:7378-7382
138. Papadopoulou, B. and P. Courvalin. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:945-948
139. Pederson, S. D., T. Jensen, D. Osterhammel and P. Osterhammel. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* -31:594-599
140. Perez-Casal, José F., and J. H. Crosa. (1984) *J. Bacteriol.* -160:256-265
141. Perkins, J. B. and P. J. Youngman. (1984) *Plasmid* -12:119-138

142. Perlin, M. H. and S. A. Lerner. (1979) *Antimicrob. Agents Chemother.* -16:598-604
143. Perlin, M. H. and S. A. Lerner. (1986) *Antimicrob. Agents Chemother.* -29:216-224
144. Perlin, M. H., S. C. Mc Carty and J. P. Greer. (1988) *Anal. Biochem.* -171:145-149
145. Peterson, B.C. and R.H.Rownd. (1983) *J. Bacteriol.* - 156:177-185
146. Polzin, K. M. and M. Shimizu-Kadota. (1987) *J. Bacteriol.* -169:5481-5488
147. Price, K.E.. (1981) *En New Trends in Antibiotics: research and therapy.* Ed. G. Gialdioni Grassi and L. Sabath. Elsevier-North Holland Biomedical Press, Amsterdam
148. Radika, K. and D. B. Northrop. (1984) *Antimicrob. Agents Chemother.* -25:479-482
149. Reed, R. R., R. A. Young, J. A. Steitz, N. D. Grindley and M. S. Guyer. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* -76:4882-4886
150. Rigby, P. W. J., M. Dieckmann, C. Rhodes and P. Berg. (1977) *J. Mol. Biol.* -113:237-251
151. Robillard, N. J., F. P. Tally and M. H. Malamy. (1985) *J. Bacteriol.* -164:1248-1255
152. Roozen, K.J., R. G. Fenwick, Jr. and R. Curtiss III. (1971) *J. Bacteriol.* -107:21-23
153. Rubens, C.E., W.F.McNeill, and W.E.Farrar. (1979) *J. Bacteriol.* -140:713-719
154. Ruiz Palacios, G. M., S. Ponce de Leon, J. Sifuentes, S. Ponce de Leon, J. J. Calvo, F. Huazano, C. Ontiveros, M. Bobadilla. (1986) *Am. J. Med.* -80:71-75
155. Saavedra, S., M.D.; D. Vera, PhD; M.T. C. H. Ramirez-Ronda, M.D.. (1986) *Am. J. Med.* - 80(suppl. 6B):65-69
156. Sadowsky, P. L., B. C. Peterson, D. N. Gerding and P. P. Cleary. (1979) *Antimicrob. Agents Chemother.* -15:616-624
157. Sapico, F. L., V. J. Ginunas, H. N. Canawati and J. Z. Montgomerie. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:81-83
158. Schlessinger, D. and G. Medoff. (1975) -535-537- *En Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents.* Ed. J. W. Corcoran and F. E. Hahn. Springer-Verlag New York-Heidelberg-Berlin
159. 2nd International Symposium on Antibiotic Resistance- Checoslovaquia. (1974) Ed. S. Mitsuhashi, L. Rosival, V. Kreméry - Checoslovaquia
160. Shapiro, J. A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* -76:1933-1937
161. Shohet, I., A. Yellin, J. Meyeroviych, and E. Rubinstein. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* - 31:982-985
162. Smeltzer, B. D., M. S. Schwartzman and J. S. Bertino. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* - 32:236-240

163. Smith, A. L., R. S. Daum, G. R. Siber, D. W. Scheifele and V. P. Syriopoulou. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:1034-1039
164. So, M., R. Gill, and S. Falkow. (1975) *Mol. Gen. Genet.* -142:239-249
165. Stachel, S., G. An, C. Flores and E. W. Nester. (1985) *EMBO J.* -4:891-898
166. Stinson, S. C. (1986) *Chem. & Eng. News* -64:33-67
167. Sundström, L., P. Radström, G. Swedberg and O. Sköld. (1988) *Mol. Gen. Genet.* -213:191-201
168. Surette, M. G., S. J. Buch and G. Chaconas (1987) *Cell* -49:253-262
169. Symonds N. (1988) *Nature* -333:18-19
170. Taber, H. W., J. P. Mueller, P. F. Miller y A. S. Arrow. (1987) *Microbiol. Rev.* -51:439-457
171. Tanaka, M., K. Matsushita and T. Yamamoto. (1985) *Antimicrob. Agents Chemother.* -28:227-234
172. Tenover, F. C. (1986) *Antimicrob. Agents Chemother.* -29:721-725
173. Tenover, F. C., D. Filpula, K. L. Phillips and J. J. Plorde. (1988) *J. Bacteriol.* -170:471-473
174. Tolmasky, M.E., R. M. Chamorro, J. H. Crosa and P. Marini. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:1416-1420
175. Tolmasky, M.E., and J. H. Crosa. (1984) *J. Bacteriol.* -160:860-866
176. Tolmasky, M.E., and J. H. Crosa. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* -31:1955-1960
177. Tolmasky, M.E., M. Roberts, M. Woloj and J. H. Crosa. (1986) *Antimicrob. Agents Chemother.* -30:315-320
178. Tomich, P. K., F. Y. An and D. B. Clewell. (1980) *J. Bacteriol.* -141:1366-1374
179. Tran Ba Huy, P. and D. Deffrennes. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* -32:467-472
180. Tran Van Nhieu, G. and E. Collata (1987) *J. Bacteriol.* -169:5708-5714
181. Tran Van Nhieu, G. F. W. Goldstein, M. E. Pinto, J. F. Acar and E. Collatz. (1986) *Antimicrob. Agents Chemother.* -29:833-837
182. Tricu-Cuot, P., M. Arthur and P. Courvalin. (1987) *Microbiol. Sciences* -4:263-266
183. Tsai, M. M., R. Y. P. Wong, A. T. Hoang and R. C. Deonier. (1987) *J. Bacteriol.* -169:5556-5562
184. Tsuda, M. and T. Iino. (1988) *Mol. Gen. Genet.* -213:72-77
185. Tsuda, M., K. I. Minegishi and T. Iino. (1989) *J. Bacteriol.* -171:1386-1393
186. Voigt, W., H. Tschäpe and H. Fleier. (1987) *J. Basic Microbiol.* -27:461-464
187. Wagenvoort, J. H. T., M. W. T. A. Fieren, W. H. F. Goessens and M. F. Michel. (1984) *Chemother.* -30:69-75

188. Wiater, L. A. and N. D. F. Grindley. (1988) EMBO J. -7:1907-1911
189. Wiebauer, K., S.Schraml, S.W.Shales and R.Schmitt. (1981) J. Bacteriol. -147:851-859
190. Williams, P. D., D. B. Bennet, C. R. Gleason and G. H. Hottendorf. (1987) Antimicrob. Agents Chemother. -31:570-574
191. Williams, J. W. and D. B. Northrop. (1976) Biochem. -15:125-131
192. Winstlade, N. E., M. H. Adelman, E. J. Evans and J. J. Schentag. (1987) Antimicrob. Agents Chemother. -31:605-609
193. Woloj, M., M. E. Tolmasky, M. C. Roberts and J. H. Crosa. (1986) Antimicrob. Agents Chemother. -29:315-319
194. Womble, D. D. and R. H. Rownd. (1988) Microbiol. Rev. -52:433-451
195. Young, L. S. (1983) En Challenges in Empiric Therapy. Ed. Bristol Labs., Division of Bristol-Myers Company.
196. Young, S. A., F. C. Tenover, T. D. Gootz, K. P. Gordon and J. J. Plorde. (1985) Antimicrob. Agents Chemother. -27:739-744
197. Zerbib, D., M. Jakowec, P. Prentki, D. J. Galas and M. Chandler. (1987) EMBO J. -6:3163-3169

ABREVIATURAS

AAC	Aminoglicósido acetiltransferasa
AAD	Aminoglicósido adeniltransferasa
AB/s	Antibiótico/s
AG/s	Aminoglicósido/s
AHBA	ácido amino- α -hidroxibutírico
Ak	Amikacina
Ak ^r	resistencia o resistente a Ak
Ak ^s	sensibilidad o sensible a Ak
ANT	Aminoglicósido nucleotidiltransferasa
Ap	Ampicilina
APH	Aminoglicósido fosforiltransferasa
Ap ^r	resistencia o resistente a Ap
Ap ^s	sensibilidad o sensible a Ap
CAT	cloranfenicol acetiltransferasa
Cm	cloranfenicol
Cm ^r	resistencia o resistente a Cm
Cm ^s	sensibilidad o sensible a Cm
Da	Dalton
DTT	ditiotreitól
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDPI	etapa dependiente de energía I
EDPII	etapa dependiente de energía II
EGA	electroforesis en gel de agarosa
EMA/s	enzima modificadora de aminoglicósidos/s
G(+)	Gram positivo
G(-)	Gram negativo
Gm	gentamicina
Gm ^r	resistencia o resistente a Gm
IHF	factor de integración del huésped
IR	repeticiones invertidas
IRS	sitio de resolución interna
IS	secuencias de inserción
K _M	constante de Michaelis-Menten
Km	Kanamicina
Km ^r	resistencia o resistente a Km
kpb	kilopares de bases
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LPS	lipopolisacáridos
MIC	concentración inhibitoria mínima
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Mz	Mezlocilina
Mz ^r	resistencia o resistente a Mz
n ^o	número
Nm	neomicina
Nm ^r	resistencia o resistente a Nm
Nm ^s	sensibilidad o sensible a Nm
OD	densidad óptica

P. aeruginosa

p.e.

S. aureus

S. fradiae

Sm

Sm^r

SO

Tc

Tc^r

Tm

Tm^r

Tris

Pseudomona aeruginosa

por ejemplo

Staphylococcus aureus

Streptomices fradiae

estreptomina

resistencia o resistente a Sm

shock osmótico

tetraciclina

resistencia o resistente a Tc

tobramicina

resistencia o resistente a Tm

2 amino-2 hidroximetil-1,3-propanodiol