

Obtención y caracterización de mutantes de *Vibrio cholerae* auxótrofos a la metionina

Karen Marrero, José Manuel Sánchez, Edith Suzarte, Javier Campos, Boris Luis Rodríguez, Yussuan Silva, Talena Ledón, Eriel Martínez y Rafael Fando.

Dpto. de Genética, Dirección de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Ciudad de La Habana, Apartado Postal 6414, Cuba.

Recibido: 16 de diciembre de 2003. Aceptado: 29 de diciembre de 2003.

Palabras clave: auxotrofia a la metionina, *Vibrio cholerae*, transposón miniTn5, vacunas vivas.
Key words: methionine auxotrophy, *Vibrio cholerae*, mini Tn5 transposon, live vaccines.

RESUMEN. Este trabajo describe la obtención de una librería de inserciones del transposón miniTn5-Km2 en *V. cholerae* y la identificación de un mutante auxótrofo a la metionina denominado ES9B9. La región del ADN cromosomal que contenía la inserción del miniTn5-Km2 en este mutante, fue clonada y secuenciada, después de lo cual, se encontró por análisis de homología con el genoma completo de *V. cholerae* N16961, que la integración del elemento de transposición había ocurrido en el gen *metF*, que codifica para la $N^{5,10}$ -metilene-tetrahidrofolato reductasa, encargada de catalizar la reducción del $N^{5,10}$ -metilene-tetrahidrofolato a N^5 -metiltetrahidrofolato. Este último se utiliza como donador del grupo metilo para la síntesis de la metionina en la última etapa de su ruta biosintética. El gen *metF* salvaje de *V. cholerae* fue amplificado por PCR y clonado, siendo utilizado en ensayos de complementación del fenotipo mutado en la cepa ES9B9, evidenciándose que la auxotrofia a la metionina se debía únicamente a la interrupción en el gen *metF*. Posteriormente, el gen *metF* salvaje clonado fue inactivado *in vitro* por una delección interna de 246 pb con la enzima de restricción *ClaI* y fue utilizado en la construcción de un derivado del candidato vacunal 638 auxótrofo a la metionina, molecularmente definido. La inactivación del gen *metF* en el candidato vacunal 638 no tuvo ningún efecto negativo sobre su velocidad de crecimiento, morfología o capacidad colonizadora respecto a la cepa parental, mientras que facilita el análisis de pureza de los lotes vacunales durante su producción a gran escala y debe limitar la proliferación ambiental de estos mutantes una vez liberados al entorno, disminuyendo el impacto ambiental de la cepa vacunal durante campañas de vacunaciones masivas.

ABSTRACT. The construction of a library of insertion mutants of *V. cholerae* by using the miniTn5-Km2 transposon module was described. A methionine auxotroph mutant designated ES9B9 was identified and characterized. The disrupted gene in ES9B9 mutant was identified by cloning and sequencing the chromosomal DNA regions flanking the inserted Tn5 and by performing a blast homology search of the sequence obtained, which revealed that the gene disrupted was *metF*. This gene is known to catalyze the reduction of N^5, N^{10} -methylene-tetrahydrofolate to N^5 -methyltetrahydrofolate which is used in the last step of methionine biosynthesis pathway as the methyl donor for homocysteine methylation to form methionine. The wild type *metF* gene of *V. cholerae* was amplified by PCR technique and cloned in *E. coli*. The cloned gene was able to complement the methionine auxotrophy in ES9B9 indicating that the disruption in *metF* is the cause of the auxotrophy. Subsequently the cloned wild type *metF* gene was inactivated *in vitro* by an in-frame *ClaI* internal deletion. This *metF*-mutated allele was used for the construction of a define methionine auxotroph mutant of the vaccine candidate 638 by allelic replacement. The 638-methionine auxotroph mutant obtained exhibited no alteration in the growth rate, cell morphology and the ability to colonize the small intestine of suckling mice compared to its parental strain 638. These results suggest that methionine auxotrophy could be a useful property of a live vaccine strain as it provides an easier way to control the purity of vaccine lots and at the same time should result in an environmental safer live vaccine with diminished proliferation capacity.

INTRODUCCION

El cólera es una enfermedad diarreica severa y muchas veces letal provocada por la bacteria Gram-negativa *V. cholerae*. En los países subdesarrollados es responsable de una significativa mortalidad y daño económico. Por ello, resulta de gran importancia obtener una vacuna segura y efectiva contra esta enfermedad.

Las investigaciones más promisorias para obtener una vacuna segura y eficaz contra el cólera se han centrado en la obtención de cepas atenuadas de *V. cholerae* para ser usadas como vacunas vivas orales, pues se demostró que el padecimiento de la enfermedad estimulaba una respuesta inmune protectora y de larga duración.¹ Sin embargo, el problema más importante asociado con el uso de las vacunas vivas está relacionado con su seguridad ambiental, debido a que pueden estar sujetas a la transferencia horizontal de material genético una vez excretadas al entorno. Así, las cepas vacunales vivas de *V. cholerae* actuales, cuya mutación atenuante fundamental ha sido la delección de los genes de la toxina del cólera (*ctxAB*), pudieran revertir a la virulencia por adquisición de estos genes, los que están contenidos en el genoma del fago filamentoso CTXΦ,² que puede transmitirlos de una cepa a otra. Se ha observado que las cepas de *V. cholerae* responsables de las epidemias actuales de cólera, O1 El Tor y O139, contienen profagos totalmente funcionales que pueden escindir y producir

partículas infectivas de CTX Φ .² Estas cepas pueden transmitir *ctxAB* a cualquier cepa de *V. cholerae*, vacunal o no, que exprese el receptor de CTX Φ , el pili co-regulado con la toxina (TCP, del inglés *Toxin Co-regulated Pili*), que constituye también un factor esencial de la bacteria para la colonización intestinal en humanos.³

Además, se ha reportado recientemente que el bacteriófago CP-T1 puede transferir el genoma completo de CTX Φ a cepas de *V. cholerae* de modo preferencial, incluyendo a aquellas que no expresan TCP.⁴ Igualmente, en el laboratorio de los autores fue identificado un fago denominado VGJ Φ , que es capaz de transmitir CTX Φ a otras cepas de *V. cholerae* por un mecanismo muy eficiente e independiente de TCP.⁵

Por todo lo anterior, se han realizado numerosos esfuerzos encaminados a disminuir la excreción y sobrevivencia de las cepas vacunales vivas en el ambiente. Una alternativa para estos fines ha sido la obtención de microorganismos auxótrofos. Esta estrategia se ha propuesto para candidatos vacunales de *V. cholerae*, mediante la introducción de auxotrofías a la timidina y al ácido aminolevulínico.^{6,7}

En el laboratorio de los autores fue construido un candidato vacunal vivo de *V. cholerae* biotipo El Tor denominado 638, al que se le deletó el profago CTXF y se le insertó el marcador *celA* en el gen de la hemaglutinina proteasa.⁸ Esta cepa fue evaluada en voluntarios con resultados muy satisfactorios, siendo inmunogénica y poco reactogénica.⁹ En ensayos de campo esta cepa será liberada al medio ambiente donde podría readquirir los genes de la toxina y contribuir a su dispersión posteriormente.

La metionina es un componente relativamente menor de las proteínas, sin embargo, el resto de sus funciones en el metabolismo bacteriano la convierten en un importante aminoácido. Así, el ARN de transferencia cargado con *N*-formilmetionina actúa como iniciador en la síntesis de proteínas en procariontes y la *S*-adenosil-metionina es el donador más importante de grupos metilo en reacciones de transferencia.¹⁰

Por todo lo anterior, se decidió incorporar una mutación en la vía biosintética de la metionina al candidato vacunal 638 que disminuyera su impacto ambiental.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas, plasmidios y medios de cultivos utilizados

La cepa *Escherichia coli* JM109 [*recA1*, *supE44*, *endA1*, *hsdR17*, *gyrA96*, *relA1*, *thi*, Δ (*lac-proAB*)] fue utilizada como hospedero durante las clonaciones en los vectores pBR322,¹¹ pUC19,¹² y pIJ2925.¹³ La cepa *E. coli* SM10 λ pir (*thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2Tc::Mu* (λ pirR6K), Km^r) fue utilizada como hospedero de los vectores suicidas pUTKm2,¹⁴ que portan los genes del transposón miniTn5-Km2, y para la clonación en el vector pCVD442,⁶ así como cepa donadora en los experimentos de conjugación con *V. cholerae*. La cepa de *V. cholerae* 638, O1, El Tor, Ogawa [Δ (profago CTX Φ), *hap::celA*]⁸ fue utilizada en la construcción de un mutante auxótrofo a la metionina molecularmente definido y el derivado de 638, S12CMY12 (Δ *asd1*), fue mutagenizado con el miniTn5-Km2. Se utilizaron los medios de cultivo LB (triptona 1%; extracto de levadura 0,5% y cloruro de sodio 1%), LB-sacarosa (triptona 1%; extracto de levadura 0,5% y sacarosa 10%), medio mínimo M9G (Na₂HPO₄ 0,6%; KH₂PO₄ 0,3%; NaCl 0,05%; NH₄Cl 0,1% y glucosa 0,2%) y Syncase (Na₂HPO₄, K₂HPO₄ y sacarosa 0,5% y NH₄Cl 0,118%). Los medios M9G y Syncase recibieron como suplemento metionina a una concentración final de 25 μ g/mL cuando fue requerido. Para preparar los medios sólidos se añadió agar al 1,5%. Los antibióticos se utilizaron a una concentración final de 100 μ g/mL de ampicilina (A), 100 μ g/mL de kanamicina (K) y 100 U/mL de polimixina (P).

Técnicas usadas en el trabajo con el ADN

El aislamiento de ADN genómico se realizó según el método de Ausubel y col.¹⁵ y la purificación de ADN plasmídico mediante los sistemas *Wizard Plus Midipreps DNA purification system* y *Wizard Plus Minipreps DNA purification system*, ambos de Promega. La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó con el sistema *GFX PCR DNA and gel band Purification* de Amersham Pharmacia Biotech según las recomendaciones del fabricante.

Las enzimas de modificación-restricción, polimerasas, nucleasas y ligasas, se utilizaron según los protocolos convencionales.¹⁵

La secuenciación del ADN se realizó por el método de Sanger,¹⁶ con el sistema de *T7 sequenase*^{v2.0} 7-deaze-dGTP suministrado por Amersham. Para la secuenciación del fragmento flanqueante a la inserción del miniTn5 se utilizaron los cebadores universales del pUC19. El resultado se comparó con la secuencia nucleotídica del genoma completo de *V. cholerae* N16961 depositada en el Instituto de Investigaciones del Genoma (TIGR, por sus siglas en inglés), EE.UU. El análisis de secuencias se realizó con los programas CLONE versión 3.11 y BioSOS versión 2.5 C.

La técnica de hibridación de *Southern blot* se realizó según Sambrook y col.¹¹ Las muestras de ADN, digeridas previamente con las enzimas de interés, fueron corridas en un gel de agarosa al 1%, transferidas a una membrana de *nylon* del tipo Hybond-N según un procedimiento de transferencia alcalina por capilaridad descendente.¹⁷ La detección se realizó con el sistema de marcado y detección no radioactivo para digoxigenina (DIG) de Böehringer Mannheim según las instrucciones del fabricante.

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se realizó para obtener la región reguladora y codificadora del gen salvaje de *V. cholerae* que contenía la inserción del miniTn5. Se amplificó un fragmento a partir del ADN cromosomal de *V. cholerae* 638, utilizando un par de cebadores que hibridan con las regiones cuesta arriba y cuesta abajo del gen con las secuencias nucleotídicas: 5'-ATACTGCAGCTCGTCGAAATGGCG-3' y 5'-AGAGCATGCGGCATGGC-3', respectivamente. En la secuencia del cebador cuesta arriba se adicionó un sitio *Pst*I para facilitar la posterior clonación del fragmento amplificado.

Transformación bacteriana

Las cepas de *E. coli* y *V. cholerae* fueron transformadas mediante electroporación, según Dower y col.¹⁸ y Stoebner y Payne,¹⁹ respectivamente.

Generación de una librería de inserciones del miniTn5-Km2 en *V. cholerae* S12CMY12 y selección de mutantes auxótrofos a metionina

El pUTKm2 fue introducido en *V. cholerae* S12CMY12 por conjugación desde la cepa *E. coli* SM10 λ pir. La mezcla de conjugación se preparó en LB, en una relación de cepa

donadora : receptora de 2 a 1, se depositó en la superficie de una placa de LB y se incubó durante 4 h a 37 °C. Los exconjugantes se resuspendieron en 2 mL de LB y se extendieron alícuotas de 0,1 a 0,5 mL en placas de M9G con suplemento de kanamicina, polimixina y metionina. Las colonias resultantes se replicaron hacia placas de LBPK y LBAK. Los clones resistentes a kanamicina y sensibles a ampicilina fueron seleccionados considerando que en su genoma se había insertado una copia del transposón sin el plasmidio acompañante. La selección de auxótrofos a metionina se realizó mediante siembra paralela en placas de medio mínimo sin suplemento aminoacídico (no crecen los mutantes auxótrofos) con suplemento de metionina (para seleccionar, de los mutantes auxótrofos, aquellos que son mutantes de la vía biosintética de la metionina por su crecimiento en esta condición). Los clones de interés fueron conservados a -70 °C en LB con glicerol al 40 %.

Caracterización de los mutantes auxótrofos obtenidos

Se analizaron las características del crecimiento a través de la determinación de los tiempos de duplicación de las cepas parentales y los mutantes en medio LB y Syncase suplementado con metionina. En ambos casos, se inoculó $1 \cdot 10^7$ células/mL en 50 mL del medio de cultivo, a partir de un precultivo crecido 12 h en el mismo medio. Se determinó la densidad óptica a 600 nm cada 20 min hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria.

Muestras de la fase exponencial y estacionaria de los cultivos fueron observadas al microscopio óptico para analizar su morfología. Se analizaron cualitativamente aspectos como forma de coma, largo y grosor de los mutantes comparados con las cepas parentales.

Clonación del fragmento de ADN cromosomal de ES9B9 que contiene la inserción del miniTn5-Km2

El ADN cromosomal fue digerido con la enzima *Bgl*II y ligado con el pBR322, previamente digerido con la enzima *Bam*HI, para obtener el plasmidio pBES.

Construcción de los plasmidios pUES, pMF29, pMFΔ*Cla*I y pCVMAΔ*Cla*I

Para la secuenciación de la región del ADN cromosomal de ES9B9 que

contenía la inserción del miniTn5-Km2, el fragmento *Sal*I del pBES que contiene al ADN cromosomal del mutante, fue clonado en el vector pUC19 digerido con la misma enzima, con lo que se obtuvo el pUES. El pMF29 fue obtenido para realizar el ensayo de complementación de los mutantes auxótrofos a metionina. Para ello, la banda de aproximadamente 1 280 pb obtenida en el PCR con los oligos descritos anteriormente, fue purificada y digerida toda la noche con las enzimas *Pst*I/*Sph*I y ligada con el vector pIJ2925, digerido con las mismas enzimas, dando lugar al plasmidio pMF29. Para obtener un alelo mutado del gen *metF*, al plasmidio pMF29 se le realizó una delección interna de 246 pb con la enzima *Cla*I con lo que se obtuvo el pMFΔ*Cla*I. Para la introducción del alelo mutado en las cepas de *V. cholerae*, el fragmento *Bgl*II del pMFΔ*Cla*I que contiene al gen *metF* mutado fue ligado con el pCVD442 digerido con la misma enzima. El plasmidio obtenido fue denominado pCVMΔ*Cla*I.

Análisis de complementación de los mutantes auxótrofos a metionina

Las cepas mutantes de *V. cholerae* fueron transformadas con el plasmidio pMF29. Los transformantes fueron seleccionados en LBA y posteriormente fueron estriados en medio M9G con ampicilina como suplemento.

Construcción de un mutante molecularmente definido de la cepa de *V. cholerae* 638 auxótrofo a la metionina

La construcción de un mutante del gen *metF* molecularmente definido fue realizada mediante reemplazamiento alélico del gen *metF* en el cromosoma de la cepa de *V. cholerae* 638 con el alelo mutado presente en el plasmidio suicida pCVMΔ*Cla*I. Este plasmidio fue introducido en *V. cholerae* mediante conjugación y los cointegrantes fueron seleccionados en placas de LBAP. El sitio de integración de los plasmidios en el cromosoma de cuatro cointegrantes fue analizado mediante *Southern blot*. Se escogieron tres clones donde la integración ocurrió por recombinación homóloga entre el alelo mutado del plasmidio y el del cromosoma, lo que originó una estructura lineal en la que ambos alelos estaban separados por secuencias de vector. Dichos clones fueron cultivados en caldos de LB sin presión

selectiva de antibióticos, condición permisiva para la proliferación de la fracción de la población microbiana que delecionó las secuencias de vector de su genoma. Los clones de esta fracción fueron seleccionados en placas de LB con sacarosa al 10 %, condición no permisiva para los pseudodiploides, debido a que la expresión del gen *sacB* del pCVD442 es tóxica para bacterias Gram-negativas en presencia de sacarosa al 5 % o concentraciones superiores. Las colonias resultantes fueron replicadas a placas de medio mínimo con suplemento de metionina y sin este para seleccionar aquellas que manifestaban auxotrofia a este aminoácido, donde probablemente había ocurrido el intercambio alélico deseado y el gen *metF* se encontraba mutado. Se seleccionaron tres segregantes auxótrofos de cada cointegrante para verificar sus estructuras genómicas a través de hibridación de *Southern blot*.

Ensayo de colonización de los mutantes en el modelo de ratón lactante

Para determinar la capacidad colonizadora de los mutantes, ratones BalB/c de 3 a 5 d de nacidos, separados de sus madres 4 h antes, fueron inoculados intragástricamente con cerca de 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) de cada cepa a analizar. Las células para el inóculo fueron crecidas en 5 mL de LB a 37 °C hasta una densidad óptica de 1 a 600 nm, partiendo de colonias frescas en placas de LB. Los ratones, luego de inoculados, fueron incubados a temperatura ambiente en ausencia de sus madres toda la noche. Al cabo de las 24 h fueron sacrificados y se les extrajo el intestino delgado, el cual fue lavado dos veces con PBS y homogenizado en un volumen de 5 mL de la misma disolución. Los títulos bacterianos en cada inóculo y los homogenizados fueron determinados extendiendo diluciones seriadas de cada uno en placas de LB.

RESULTADOS Y DISCUSION Generación de una librería de inserciones del miniTn5-Km2 en *V. cholerae* S12CMY12 y selección de un mutante auxótrofo a metionina

La librería de inserciones en el genoma de la cepa de *V. cholerae* S12CMY12 generada con el mini-transposón miniTn5-Km2 contenido en el pUTKm2 originó cerca de 2 500 clones. El 50 % de ellos constituyó el producto de la integración

del plasmidio pUTKm2 en el ADN cromosomal de S12CMY12, mientras que el otro 50 % correspondió a la transposición del elemento de inserción únicamente. Los mutantes auxotróficos fueron seleccionados según se explicó en *Materiales y Métodos*. Entre ellos, el mutante designado ES9B9, originado por transposición, fue seleccionado para un análisis posterior debido a su crecimiento en medio mínimo con glucosa, sales minerales y metionina y la ausencia de crecimiento en el mismo medio sin metionina.

Análisis de la región del ADN cromosomal que contiene la inserción del miniTn5 en ES9B9

Se realizó una hibridación de *Southern blot* con el objetivo de determinar el número de inserciones del transposón en el genoma de ES9B9 y caracterizar el tamaño del fragmento que contenía la inserción con diferentes enzimas de restricción. Se utilizaron las enzimas de restricción *EcoRI*, *DraI*, *NcoI* y *NdeI*, que no tienen sitios de corte dentro del módulo de inserción del miniTn5. Además, fue utilizada la enzima *BglII*, que corta en el extremo I del miniTn5-Km2, y se utilizó como sonda para la detección de los fragmentos, la banda *EcoRI* del pUTKm2 de aproximadamente 1,8 kb que contiene al miniTn5-Km2.

Las enzimas *DraI*, *NdeI*, *NcoI* y *BglII* generaron una única banda de más de 5; 20; 5,5 y 5 kb respectivamente (Fig. 1), que hibridaron específicamente con la sonda empleada, lo que evidencia que solo se produjo una inserción del transposón en el genoma de la cepa ES9B9 y que la digestión con las enzimas *DraI*, *NcoI* y *BglII* resulta en bandas que contienen los fragmentos adyacentes al miniTn5-Km2, de talla molecular adecuada para la posterior clonación.

Características del crecimiento, morfología y colonización en el modelo de ratón lactante de ES9B9

Los tiempos de duplicación del mutante en medios LB y Syncase con suplemento de metionina fueron analizados para determinar si la auxotrofia a la metionina introducía variaciones en *V. cholerae* que limitaran el proceso de producción de una vacuna. El tiempo de duplicación para ES9B9 en LB y Syncase con metionina fue de 19,44 y 43,87 min, respectivamente y para S12CMY12, en esos mismos medios, fue de 19,5 y 47,4 min. Como se observa, los tiempos de duplicación del mutante

en los diferentes medios no muestran diferencias con los de la cepa parental crecida en las mismas condiciones. Tampoco fueron observadas diferencias morfológicas entre las células de ambas cepas en estos medios, en cuanto a tamaño, grosor y forma de las bacterias. Por último, a ES9B9 se le analizó su capacidad colonizadora en el modelo de ratón neonato con el objetivo de determinar si la auxotrofia a metionina limitaba la capacidad de *V. cholerae* para colonizar el intestino de este modelo animal. El ensayo se realizó de modo comparativo con las cepas 638, S12CMY12 y ES9B9. Los resultados indican que la auxotrofia a la metionina, inducida por la inserción presente en ES9B9, no limita la colonización de los vibrios en el intestino del ratón recién nacido (Tabla 1).

De acuerdo con estos resultados, el gen inactivado por la inserción del módulo del Tn5 crea una auxotrofia a la metionina que no limita la capacidad colonizadora de *V. cholerae* en el modelo del ratón lactante, ni afecta las propiedades de crecimiento o morfológicas de la cepa. Esto hace factible la construcción de un mutante definido en este gen con propósitos vacunales.

Clonación del fragmento de ADN cromosomal de ES9B9 que contiene la inserción del miniTn5-Km2

La digestión con *BglII* del ADN cromosomal de ES9B9 produjo una banda de 5 kb que contiene al mi-

niTn5 y la región del ADN cromosomal adyacente al extremo O del miniTn5-Km2. Este fragmento fue clonado en el pBR322 según el procedimiento descrito en *Materiales y Métodos*, obteniéndose el pBES (Fig. 2). Este clon recombinante fue seleccionado mediante la resistencia a kanamicina conferida por el marcador del miniTn5-Km2. La orientación del fragmento clonado se determinó por análisis de restricción con *EcoRI* y se caracterizó el fragmento flanqueante al transposón en cuanto a la presencia o no de sitios para las enzimas *EcoRV*, *SalI*, *XhoI*, *XbaI* y *NotI*, entre otras (Fig. 2).

La enzima *SalI* tiene un sitio de corte en el extremo O del módulo de transposición y otro sitio en la secuencia del pBR322 cercano al *BamHI* utilizado para la clonación. La digestión del pBES con esta enzima genera un fragmento de alrededor de 5 kb que contiene al fragmento proveniente del cromosoma de *V. cholerae*. Este fragmento fue purificado y subclonado en el vector pUC19 linealizado con la misma enzima con el objetivo de determinar su secuencia, con lo cual se obtuvo el pUES (Fig. 3). Una digestión del pUES con la enzima *HindIII*, que tiene un sitio de corte en el pUC19 cercano a la secuencia de corte de *SalI* utilizado para la clonación y otro en el extremo O del miniTn5, permitió determinar la orientación del fragmento al obtener una banda única de cerca de 6,0 kb. La identi-

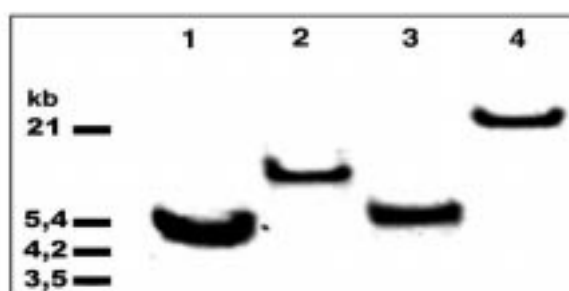


Fig 1. Análisis de Southern blot de la cepa *V. cholerae* ES9B9 utilizando como sonda al miniTn5-Km2. El ADN cromosomal de ES9B9 fue digerido con las enzimas: 1, *BglII*; 2, *DraI*; 3, *NcoI* y 4, *NdeI*. A la izquierda se muestra el patrón de peso molecular de ADN del fago λ digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

Tabla 1. Colonización de las cepas de *V. cholerae* 638, S12CMY12 y ES9B9, en el intestino delgado del ratón lactante. Para cada cepa se muestra la media geométrica de las UFC en cinco ratones.

Cepa	UFC-Inóculo	UFC- Recuperadas
638	2,5 · 10 ⁶	1,0 · 10 ⁶
S12CMY12	1,0 · 10 ⁶	1,0 · 10 ⁶
ES9B9	1,5 · 10 ⁶	1,8 · 10 ⁶

dad de la banda clonada se chequeó por digestión con *NcoI* y *MluI*.

Identificación de la región de ADN cromosomal de ES9B9 adyacente a la inserción del miniTn5-Km2

La secuencia nucleotídica del fragmento que contiene la inserción

del miniTn5-Km2 se estableció a partir del pUES, utilizando los cebadores universales directo (-40) y reverso (-21) del pUC19. La figura 3 muestra parte de la secuencia obtenida con el cebador reverso. El total de bases secuenciado fue de 329 nucleótidos, de los cuales, 67 pb co-

respondieron al extremo O del miniTn5. Al comparar la secuencia de los 264 nucleótidos restantes, que proceden del cromosoma de *V. cholerae*, con la secuencia nucleotídica del genoma completo de la cepa de *V. cholerae* N16961 depositada en el TIGR, se encontró que esta secuencia tenía homología con el gen *metF* y es idéntica a la secuencia depositada en el TIGR excepto en un nucleótido. Este gen codifica para la N^{5,10}-metilenetetrahidrofolato reductasa, encargada de catalizar la reducción del N^{5,10}-metilenetetrahidrofolato a N⁵-metiltetrahidrofolato, el que posteriormente es utilizado como donador del grupo metilo durante la metilación de la homocisteína, en el último paso de la vía biosintética de la metionina.

Al analizar la región adyacente a *metF*, en el genoma de *V. cholerae* N16961, se encontró que la organización génica es similar a la de *E. coli*, donde se ha descrito que los genes *metJ*, *metB*, *metL* y *metF* se encuentran agrupados^{20,21} (Fig. 4). El gen *metJ* codifica para un represor²² que junto a la S-adenosilmetionina²³

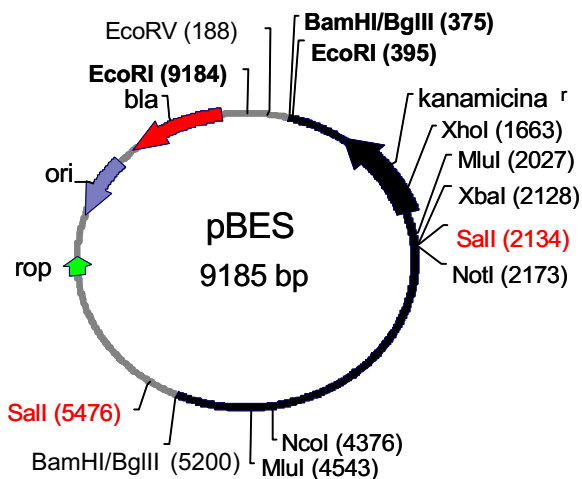


Fig 2. Mapa genético del plasmidio pBES. Se señalan en negritas las uniones BamHI/BglIII entre el pBR322 y el fragmento clonado, así como los sitios EcoRI utilizados. Aparece en rayado el miniTn5 y en negro la región flanqueante al miniTn5 en ES9B9.

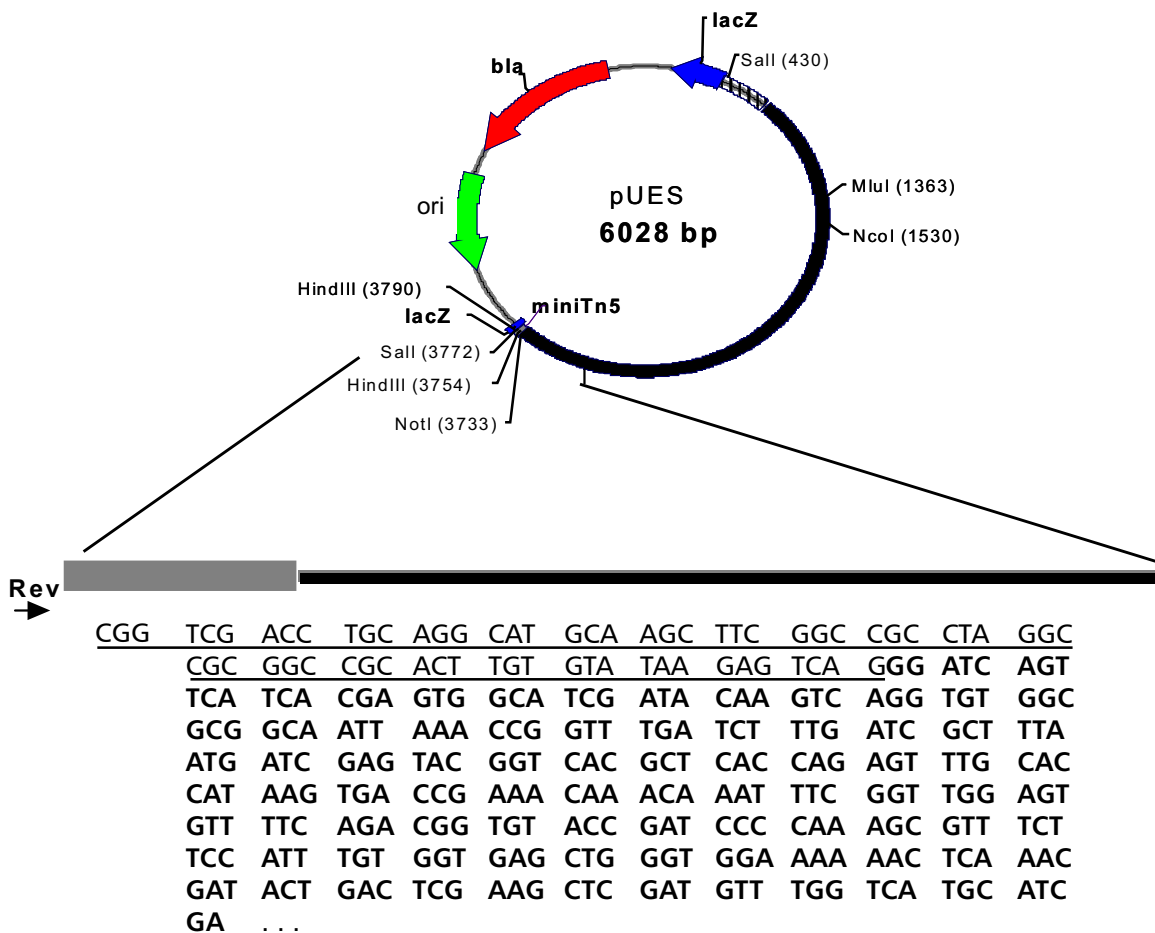


Fig 3. Mapa genético del plasmidio pUES y parte de la secuencia nucleotídica obtenida a partir de él con el cebador universal reverso (-21) del pUC19. Aparece subrayada la secuencia perteneciente al módulo de transposición del miniTn5-Km2; el resto se corresponde con el ADN de *V. cholerae* ES9B9 clonado.

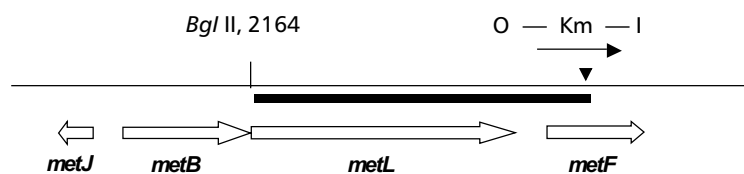


Fig 4. Mapa genético de la región (~6,75 kb) del cromosoma I de *V. cholerae* N16961 que porta los genes *metJBLF*. En negro se señala el sitio de inserción y la orientación del módulo *miniTn5-Km2* en el cromosoma del mutante ES9B9. La línea gruesa en negro representa el fragmento de ADN de *V. cholerae* clonado en *pBES* y luego subclonado en *pUES*.

inhibe la transcripción de los genes biosintéticos de la metionina, que constituyen el regulón *met*. *MetJ* se une a la secuencia consenso 5'-AGACGTCT-3' denominada caja MET,²⁴ que se encuentra repetida en tándem en la región promotora de estos genes. Los genes *metB* y *metL* comprenden el único operón conocido del regulón *met*.²⁵ La secuencia del operón completo de *E. coli* ha sido determinada^{21,26} y solo dos bases separan el TAA terminal de *metB* y el ATG iniciador de *metL*. Las secuencias codificantes de *metJ* y *metBL* son divergentemente transcritas desde una región intergénica de 276 pb de longitud en *E. coli*²⁷ y 264 pb de longitud en *S. typhimurium*.²⁸ El gen *metB* codifica para la cistionina sintasa y *metL* para la aspartoquinasa II-homoserina deshidrogenasa II. En *V. cholerae*, en particular, los codones de terminación y comienzo de *metB* y *metL*, respectivamente, están separados por 13 pb y la secuencia intergénica entre *metJ* y *metBL* es de 268 pb.

La secuencia del gen *metF* de *E. coli* y *S. typhimurium* ha sido determinada.^{29,30} La expresión de *metF* es regulada por el sistema *MetJ*.³¹ El sitio de unión de *MetJ* contiene cinco cajas MET.³² Además, se ha descrito que existe un sistema regulador positivo, *MetR*, que controla la expresión de *metF*, oponiéndose a la represión por *MetJ*.³³ Así, se ha descrito la existencia de tres sitios de unión para *MetR* en la región promotora de *metF*.³³ El mecanismo de regulación de la expresión de *metF* en *V. cholerae* debe ser igual al descrito para *E. coli* y *S. typhimurium*, ya que en la región no codificadora que antecede a *metF* se identificaron tres secuencias con una gran homología con la secuencia de unión consenso del activador *MetR* y al menos tres para *MetJ* (Fig. 5).

La inserción del *miniTn5-Km2* en el gen *metF*, parece ser la responsable de la auxotrofia a la metionina encontrada en la cepa ES9B9. Resultados semejantes se reportan en *Streptomyces lividans*,³⁴ en los que

la cepa mutada en *metF* muestra una auxotrofia a la metionina.

Clonación del gen *metF* salvaje de *V. cholerae*

La región codificadora y reguladora del gen *metF* de *V. cholerae* 638 fue amplificada mediante PCR. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados para amplificar un producto de 1 280 pb compuesto por 912 pb de la región codificadora, 125 pb del extremo 3' no codificadora que incluye el codón de terminación TAA y un terminador transcripcional y 242 pb de la región 5' no codificadora, donde están contenidos (i) el sitio de unión al ribosoma, (ii) la región de unión del complejo *S*-adenosilmetionina y la proteína *MetJ*, (iii) los sitios de unión de la proteína *MetR*, y (iv) el promotor bacteriano (Fig. 5).

Como se describe en la sección correspondiente de *Materiales y Métodos*, el fragmento amplificado por PCR se purificó y se clonó en el *pIJ2925*, con lo que se obtuvo el *pMF29*, que fue utilizado para el análisis de complementación de los mutantes obtenidos.

Construcción de un mutante de *V. cholerae* auxótrofo a la metionina molecularmente definido

Teniendo en cuenta que la mutación en el gen *metF* en *V. cholerae* genera una auxotrofia a la metionina, se construyó un mutante de la cepa vacunal *V. cholerae* 638 con la *N*^{5,10}-metilnetetrahidrofolato reductasa inactiva, y se obtuvo de esta forma, un candidato vacunal con capacidad proliferativa disminuida en ausencia de metionina. Para ello, el plasmidio *pCVMΔClaI* fue introducido en *V. cholerae* 638 por conjugación y los exconjugantes fueron extendidos en placas de LBPA. Se seleccionaron cuatro transformantes resistentes a ampicilina para analizar sus estructuras génicas a través de hibridación de *Southern blot*, utilizando como sonda el fragmento *BglII* del *pMF29* que porta al gen *metF* salvaje. El ADN cromosomal

(ADNc) de los transformantes seleccionados fue digerido con la enzima *NcoI*. La digestión de los ADNc de los transformantes en los cuales el *pCVMΔClaI* se insertó por recombinación homóloga entre el gen *metF* mutado y el gen tipo salvaje presente en el genoma de la bacteria, debe producir una única banda de 10 877 pb, mientras que la digestión de la cepa parental debe originar una banda de 3 643 pb. Los transformantes seleccionados produjeron el patrón esperado, lo que indica que en todos ocurrió la inserción del plasmidio en el gen *metF* del cromosoma de 638 (Fig. 6).

A continuación, los cointegranes C1, C5 y C18 fueron crecidos en LB, según se explica en *Materiales y Métodos*. Se seleccionaron cinco segregantes, provenientes de los cointegranes C18 y C5, que mostraron auxotrofia a la metionina en Syncase mínimo, para chequear por hibridación de *Southern blot* que en efecto la auxotrofia a dicho aminoácido se debía a la presencia del gen mutado en sus genomas. Se realizó una digestión de sus ADNc con la enzima *HincII* que en el caso de los mutantes debe arrojar como resultado dos bandas de 1 292 pb y 991 pb, mientras que en la cepa parental esta digestión genera dos bandas de 1 292 pb y 1 237 pb. En el análisis por *Southern blot* de los segregantes seleccionados se observó que todos contenían la delección en el gen *metF* (Fig. 6). Para ensayos posteriores fueron seleccionados tres segregantes derivados del transformante C18, los que se usaron como réplicas y se denominaron 638M18_1, 638M18_2 y 638M18_3.

Complementación de los mutantes de *V. cholerae* auxótrofos a la metionina

Para determinar si la auxotrofia a la metionina manifestada por los mutantes ES9B9, 638M18_1, 638M18_2 y 638M18_3 se debía únicamente a la presencia del gen *metF* mutado, se realizó un análisis de complementación con el gen *metF* intacto presente en el *pMF29*. Se observó que los mutantes que contenían al plasmidio recombinante crecieron en ausencia de metionina, revelando una complementación del fenotipo mutante, sin embargo, los mutantes que contenían al *pMFΔClaI* solo crecieron en placas del mismo medio con metionina. Se evidenció que la auxotrofia a este aminoácido en los mutantes obtenidos se debe solamente a la mutación en el gen *metF*.

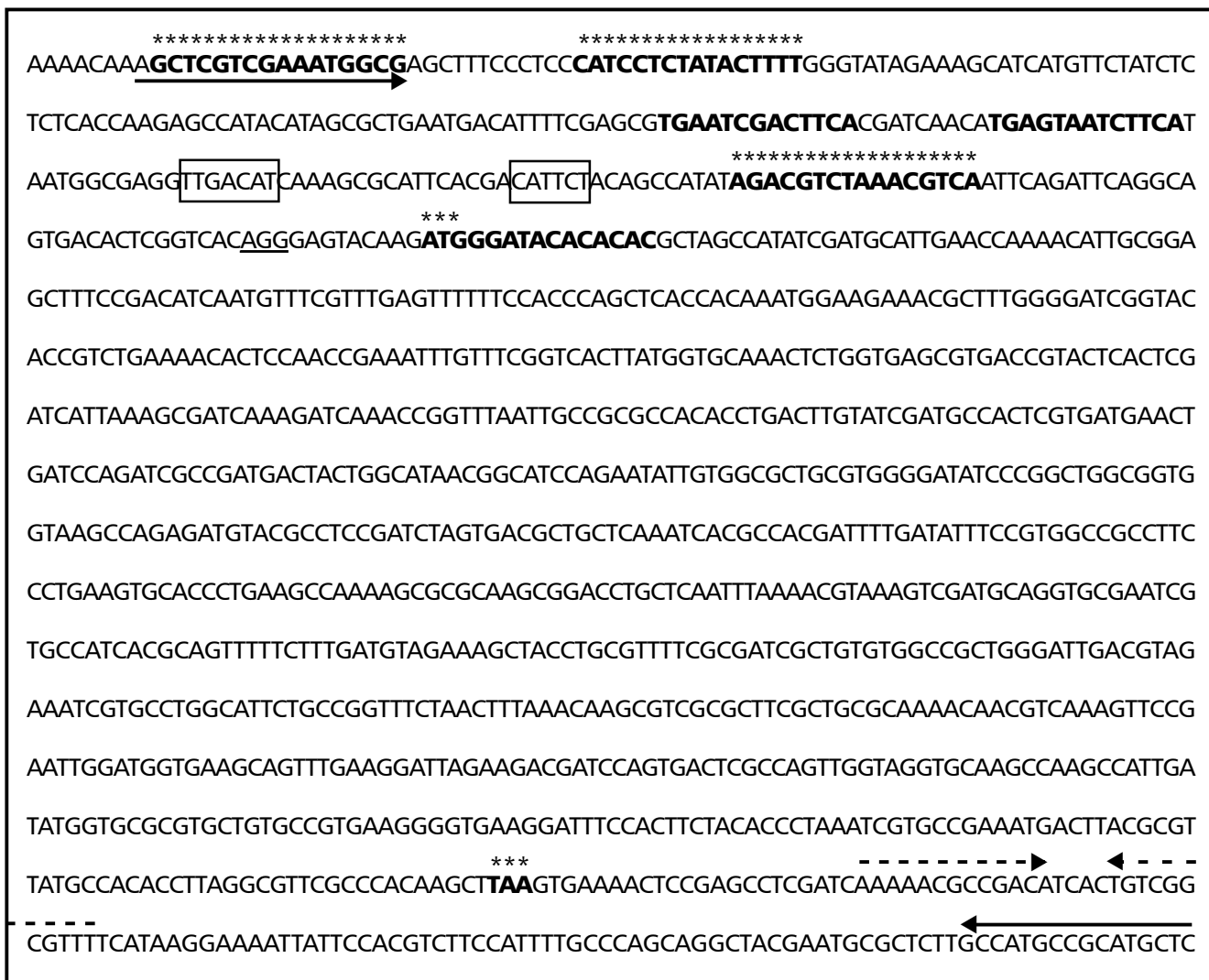


Fig. 5. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen *metF* de *V. cholerae* obtenida del TIGR. Los oligos utilizados para amplificar el gen por PCR aparecen representados por flechas. En negritas se representan las secuencias de unión de *MetR*, el codón de iniciación y el de terminación de *metF*. Estos últimos se señalan además, con asteriscos. Los sitios de unión a *MetJ* se señalan en negro y con asteriscos. Los nucleótidos en los recuadros representan las regiones -10 y -35 del promotor. Se subraya el sitio de unión al ribosoma y se señala con flechas discontinuas el terminador de la transcripción.



Fig. 6. Análisis por Southern blot de la estructura génica de los cointegrantes del *pCVMFΔClnI* en la cepa *V. cholerae* 638 y segregantes derivados. Se usó como sonda el fragmento *BglII* del plasmidio *pMF29* que contenía al gen *metF* intacto. Los ADNc de los diferentes cointegrantes (C) fueron digeridos con *NcoI* y el de los segregantes (M) con *HincII* y fueron aplicados en el siguiente orden: **a**, C1; **b**, C2; **c**, C5; **d**, C18; **e**, 638 (*NcoI*); **f**, M18_1; **g**, M18_2; **h**, M18_3; **i**, M5_1; **j**, M5_2 y **k**, 638 (*HincII*). El marcador de peso molecular de ADN del fago λ digerido con las enzimas *HindIII* y *EcoRI* se representa a la izquierda.

Caracterización de los mutantes 638M18_1, 638M18_2 y 638M18_3 en cuanto a crecimiento, morfología y colonización en modelo de ratón lactante

A los mutantes se les realizó un análisis de sus velocidades de crecimiento, morfología y colonización en el modelo de ratón lactante para determinar si las manipulaciones genéticas realizadas no tuvieron algún efecto negativo sobre estas características que pudieran limitar su posible uso como cepa vacunal. Las características del crecimiento de los mutantes fueron analizadas en medios rico (LB) y mínimo (Syncase con metionina), y comparadas con la cepa parental (Tabla 2). La mutación presente en el gen *metF* no afectó la velocidad de crecimiento de las cepas mutadas en medio rico (LB) ni en medio míni-

mo (Syncase con metionina), por lo que se espera que los mutantes vacunales *metF* colonicen adecuadamente el tracto gastrointestinal murino y humano. La morfología de los mutantes durante el crecimiento en ambos medios fue similar a la de la cepa parental; no se detectó ningún cambio en la forma de coma, en el tamaño o el grosor de las células de los mutantes en comparación con la cepa parental. Para determinar la capacidad colonizadora de los mutantes se utilizó el modelo de colonización de ratón lactante explicado en la sección de *Materiales y Métodos*. Se observó que la colonización de los mutantes fue similar a la de la cepa parental (Tabla 3), lo que demuestra que la cepa auxótrofa a metionina coloniza apropiadamente el intestino delgado murino. Se ha reportado que la inactivación de genes bacterianos esenciales para la multiplicación de los microorganismos patógenos, limita su capacidad de colonización en sus hospederos y disminuye su inmunogenicidad, debido a que probablemente la cepa mutada no persiste largo tiempo.⁷ Sin embargo, la auxotrofia a la metionina no disminuye la colonización de *V. cholerae*, debido probablemente a que el intestino es rico en metionina y la cepa se nutre a expensas de esta.

CONCLUSIONES

Se pudo concluir que la interrupción del gen *metF* conduce a una auxotrofia a la metionina en *V. cholerae* que no afecta la habilidad del microorganismo de colonizar en el modelo de ratón lactante, así como tampoco produce cambios evidentes en la morfología o características del crecimiento de las cepas auxótrofas respecto a la cepa parental. Por otro lado, el gen *metF* en *V. cholerae* se encuentra agrupado con otros tres genes de la ruta biosintética de la metionina formando el "cluster" *metJBLF*, con

Tabla 3. Colonización de la cepa vacunal de *V. cholerae* 638 y sus derivadas mutantes en *metF*, en el modelo de ratón lactante. Para cada cepa se muestra la media geométrica de las UFC en cinco ratones.

Cepa	UFC-Inóculo	UFC-Recuperadas
638	1,1 · 10 ⁶	6,4 · 10 ⁵
638M18_1	1,1 · 10 ⁶	5,0 · 10 ⁵
638M18_2	1,5 · 10 ⁶	3,7 · 10 ⁵
638M18_3	1,1 · 10 ⁶	2,4 · 10 ⁵

una organización similar a la reportada en *E. coli*.

BIBLIOGRAFIA

- Cash R.A., Music S.I., Libonati J.P., Craig J.P., Pierce N.F. and Hornick R.B. Response of man to infection with *V. cholerae*. II. Protection from illness afforded by previous disease and vaccine, **J. Infect. Dis.**, **130**, 325, 1974.
- Waldor M.K. and Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by filamentous phage encoding cholera toxin, **Science**, **272**, 1910, 1996.
- Herrington D.A., Hall R.H., Losonsky G., Mekalanos J.J., Taylor R.K. and Levine M.M. Toxin, toxin-coregulated pili and the *toxR* regulon are essential for *V. cholerae* pathogenesis in humans. **J. Exp. Med.**, **168**, 1487, 1988.
- Boyd E.F. and Waldor M.K. Alternative mechanism of cholera toxin acquisition by *Vibrio cholerae*: generalized transduction of CTXΦ by bacteriophage CP-T1. **Infect. Immun.**, **67**, 5898, 1999.
- Campos J. *et al.* Novel type of specialized transduction for transmission of CTXΦ or its satellite phage RS1 in *V. cholerae*. **J. Bacteriol.**, **185**, 5563, 2003.
- Valle E., *et al.* Construction and characterization of a nonproliferative El Tor cholerae vaccine candidate derived from strain 638. **Infect Immun.**, **68**, 6411, 2000.
- Rijpkema S.G., *et al.* Construction and analysis of a *Vibrio cholerae* delta-aminolevulinic acid auxotroph which confers protective immunity in a rabbit model. **Infect. Immun.**, **60**, 2188, 1992.
- Robert A., *et al.* Tagging a *V. cholerae* El Tor candidate vaccine strain by dis-

ruption of its hemagglutinin/protease gene using a novel reporter enzyme: *Clostridium thermocellum* endoglucanase A. **Vaccine**, **14**, 1517, 1996.

- Benítez J.A. *et al.* Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTXΦ-negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. **Infect. Immun.**, **67**, 539, 1999.
- Neidhardt F.C., *et al.* *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, Chapter 33. 2nd Ed., ASM Press, Washington DC, 542-560, 1996.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Yanisch-Perron C., Vieira J. and Messing J. Improved M13phage vectors and host strain: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19. **Gene**, **33**, 103, 1985.
- Janssen G.R. and Bibb M.J. Derivatives of pUC18 that have BglIII sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of *Escherichia coli* colonies. **Gene**, **124**, 133, 1993.
- De Lorenzo V., Herrero M., Sánchez J.M. and Timmis K.N. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram negative eubacteria. **J. Bacteriol.**, **172**, 6568, 1998.
- Ausubel F.M., *et al.* Short protocols in molecular biology, 3rd Ed., John Wiley & Song Inc., New York, USA, 1995.
- Sanger F. and Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J. Mol. Biol.**, **94**, 441, 1975.
- Chomazynski P. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. **Analyt. Biochem.**, **201**, 134, 1992.
- Dower W.J., Miller J.F. and Ragsdale C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acid Res.**, **16**, 6127, 1988.
- Stoebner J.A. and Payne S.M. Iron regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *V. cholerae*. **Infect. Immun.**, **56**, 2891, 1988.
- Johnson J.R., Greene R.C. and Krueger. Isolation and characterization of specialized lambda transduc-

Tabla 2. Tiempos de duplicación en los medios LB y mínimo (Syncase con suplemento de metionina) de la cepa vacunal de *V. cholerae* 638 y sus derivadas, mutantes en *metF*.

Cepas de <i>V. cholerae</i>	Tiempo de duplicación en los medios de cultivo (min)	
	LB	Syncase + lisina o metionina
638	18,67 ± 4,5	43,44 ± 4,3
638M18_1	22,98 ± 4,8	44,34 ± 2,5
638M18_2	22,94 ± 5,4	45,65 ± 3,5
638M18_3	21,71 ± 3,6	44,97 ± 4,5

- ing bacteriophage carrying the *metJBLF* methionine gene cluster. **J. Bacteriol.**, **131**, 795, 1977.
21. Duchange N., *et al.* Structure of the *metJBLF* cluster in *E. coli* K12. Sequence of *metB* structural gene and of 5'- and 3'-flanking regions of the *metBL* operon. **J. Biol. Chem.**, **258**, 14868, 1983.
 22. Smith A.A., Greene R.C., Kirby T.W. and Hindenach B.R. Isolation and characterization of the product of the methionine regulatory gene, *metJ*, of *E. coli* K12. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **82**, 6104, 1985.
 23. Shoeman R., *et al.* Regulation of methionine synthesis in *E. coli*: effect of the *metJ* gene product and S-adenosylmethionine on the *in vitro* expression of the *metB*, *metL* and *metJ* genes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **133**, 731, 1985.
 24. Old I.G., Phillips S.E.V., Stockley P.G. and Saint-Girons I. Regulation of methionine biosynthesis in *Enterobacteriaceae*. **Prog. Biphys. Mol. Biol.**, **56**, 145, 1991.
 25. Greene R.C., and Smith A.A. Insertion mutagenesis of the *metJBLF* gene cluster of *E. coli*: evidence for a *metBL* operon. **J. Bacteriol.**, **159**, 767, 1984.
 26. Zakin M.M., Duchange N., Ferrara P. and Cohen G.N. Nucleotide sequence of the *metL* gene of *E. coli*. Its product, the bifunctional aspartokinase II-homoserine dehydrogenase II, and the bifunctional product of the *thrA* gene, aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I, derive from a common ancestor. **J. Biol. Chem.**, **258**, 3028, 1983.
 27. Saint-Girons I., Duchange N., Cohen G.N. and Zakin M.M. Structure and autoregulation of the *metJ* regulatory gene in *E. coli*. **J. Biol. Chem.**, **259**, 14282, 1984.
 28. Urbanowski M.L. and Stauffer G.V. Nucleotide sequence and biochemical characterization of the *metJ* gene from *S. typhimurium* LT2. **Nucleic Acids Res.**, **13**, 673, 1985.
 29. Saint-Girons I., *et al.* Nucleotide sequence of *metF*, the *E. coli* structural gene for 5-10 methylenetetrahydrofolate reductase and of its control region. **Nucleic Acids Res.**, **11**, 6723, 1983.
 30. Stauffer G.V. and Stauffer L.T. Cloning and nucleotide sequence of the *S. typhimurium* LT2 *metF* gene and its homology with the corresponding sequence of *E. coli*. **Mol. Gen. Genet.**, **212**, 246, 1988.
 31. Shoeman R., *et al.* Regulation of methionine synthesis in *E. coli*: effect of *metJ* gene product and S-adenosylmethionine on the expression of the *metF* gene. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **82**, 3601, 1985.
 32. Davidson B.E. and Saint-Girons I. The *E. coli* regulatory protein MetJ binds to a tandemly repeated 8 bp palindrome. **Mol. Microbiol.**, **3**, 1639, 1989.
 33. Cowan J.M., Urbanowsky M.I., Talmi M. and Stauffer G.V. Regulation of the *S. typhimurium met F* gene by the MetR protein. **J. Bacteriol.**, **175**, 5864, 1993.
 34. Blanco J., Coque J.J. and Martin J.F. The Folate Branch of the Methionine Biosynthesis Pathway in *Streptomyces lividans*: Disruption of the 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Leads to Methionine Auxotrophy. **J. Bacteriol.**, **180**, 1586, 1998.



RESULTADOS CIENTIFICOS DESTACADOS
MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

VIRUS DEL ENCRESPAMIENTO AMARILLO DE LA HOJA DE TOMATE (TYLCV)

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.
Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova".

Los begomovirus han sido considerados por las organizaciones internacionales de fitopatología, uno de los tres virus emergentes que afectan las plantas, convirtiéndose en la mayor causa de pérdidas del cultivo de tomate en la mayoría de los países tropicales y subtropicales. El TYLCV, en particular, es el begomovirus de mayor impacto por su rápido paso del viejo al nuevo mundo y su rápida adaptación e implantación en este hemisferio, siendo el responsable de las mayores pérdidas informadas en el cultivo del tomate en los últimos 10 años.

A partir de lo anterior, se realizó por primera vez en Cuba y en la región de América Latina y el Caribe, un estudio integral del TYLCV-Is que incluyó el conocimiento de la variabilidad genética y evolución del virus, detección de nuevos hospedantes alternativos de importancia económica, la evaluación y validación de nuevos métodos para su diagnóstico, así como, la aplicación de estos últimos en la evaluación y selección de las plantas resistentes al virus. Adicionalmente, se determinó la distribución del virus en las regiones productoras de tomate de mayor importancia del país.

Los resultados permitieron informar, por primera vez en Cuba, la presencia del TYLCV infectando de forma natural plantas de pimiento, frijol y calabaza (lo que constituyó el primer informe de su detección en estas dos últimas plantas para el hemisferio occidental), lo cual es de gran importancia, no solo por la repercusión económica en estos cultivos, sino también, porque ellos son frecuentemente utilizados como cultivos colindantes de las plantaciones de tomate, lo que ayudaría a convertir estas plantas en hospedantes o reservorios activos del virus.

Para la detección del begomovirus, se estableció un novedoso método de hibridación no radiactivo de los ácidos nucleicos que mostró parámetros de eficacia, sensibilidad, especificidad y valores predictivos por encima del 90 % y resultó de elevada factibilidad de uso para el diagnóstico de TYLCV en Cuba, al compararlo con los métodos utilizados hasta ese momento. Se elaboró una metodología para la evaluación y selección de plantas resistentes al virus, mediante la aplicación del diagnóstico molecular, utilizando la HAN no radioactiva para la detección de begomovirus en el país, que ya ha sido introducida, demostrándose su utilidad.