

# Bacterias con alta tasa de mutación: los riesgos de una vida acelerada

High mutation rate bacteria: Risks of a high-speed life

Fecha de recepción: 14/12/2005  
Fecha de aceptación: 03/03/2006

JUAN CARLOS GALÁN, MARÍA ROSARIO BAQUERO,  
MARÍA ISABEL MOROSINI, FERNANDO BAQUERO\*

## Resumen

El proceso evolutivo de un ser vivo se acelera cuanto mayor sea su capacidad para producir variabilidad genética, bien por mutación, bien por recombinación. Sin embargo, cuanto mayor sea esta capacidad, mayor también será el riesgo de acumular mutaciones deletéreas. La variabilidad genética es, por tanto, un proceso altamente regulado, de tal manera que las bacterias tienden a mantener una baja tasa de mutación. En diferentes poblaciones bacterianas analizadas hay siempre un porcentaje variable de cepas con una tasa de mutación superior a la frecuencia modal del resto de la población. Existe una relación directa entre la proporción de cepas que mutan y el grado de estrés del ambiente. Así, en los procesos infecciosos crónicos, en los que el tratamiento antibiótico es constante durante períodos prolongados, se observan los mayores porcentajes de bacterias que mutan, cercano al 50% de la población. Esta selección positiva de bacterias que mutan es debida al enorme potencial que presentan para desarrollar resistencia antibiótica (100 veces superior a una bacteria normal). Esta capacidad ha sido explotada, en algunos centros de investigación, como un modelo natural de evolución acelerada para predecir la facilidad con la que determinadas variantes resistentes pueden aparecer, saber qué posiciones serán las más susceptibles a los cambios y cuál será el costo para la bacteria. El laboratorio de microbiología debe hacer un esfuerzo por detectar estas cepas mutadoras antes de que desarrollen mecanismos de resistencia e induzcan el fracaso terapéutico.

**Palabras clave:** evolución, recombinación genética, mutagénesis, resistencia bacteriana a medicamentos.

*Infectio 2006; 10(1): 22-29*

## Abstract

The potential of producing genetic variability, either by mutation or by recombination, is the driving force of evolution in a living organism. Genetic variability is a quite regulated process in which bacteria tend to maintain a low mutation rate. However, a variable proportion of bacteria with a higher mutation rate than that of the modal is always present in any population. Moreover, a direct relationship exists between the proportion of mutator strains and environmental stress. In chronic infectious diseases, due to prolonged antibiotic regimens, nearly 50% of the population may be represented by mutating bacteria. Such a positive selection is due to the capacity of this type of strains to develop antibiotic resistance (100 fold higher than normal bacteria). This trait has been used as an accelerated-evolution model to predict the ease of certain resistant variants to emerge as well as to infer which targets are more prone to be modified and the concomitant cost that such variability would imply to the organism.

The Microbiology laboratory might then do an effort to detect mutating strains before the appearance of resistance mechanisms that may lead to therapeutic failures.

**Keywords:** evolution, genetic recombination, mutagenesis, bacterial drug resistance.

*Infectio 2006; 10(1): 22-29*

\* Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Crta de Colmenar Km. 9, 100, 28034 Madrid. España.

\*Correspondencia: jgalanm.hrc@salud.madrid.org

## INTRODUCCIÓN

La evolución es, desde un prisma estrictamente darwinista, el resultado de la adaptación continua de un organismo a ambientes cambiantes o diferentes. Cuanto más adaptado esté un microorganismo a un ambiente, menor será su frecuencia de mutación, ya que la mayoría de las mutaciones serán neutras o deletéreas (1). Por otra parte, cualquier modificación de la estructura génica de un individuo supone la posibilidad de conquistar o sobrevivir en nuevos ambientes. Así, el proceso evolutivo de un microorganismo se aceleraría, cuanto mayor fuera la capacidad de un individuo, o de una población clonal aislada, para producir variabilidad genética.

La evolución microbiana depende, por tanto, de dos fuerzas contrapuestas: por un lado, el mantenimiento de la información genética (las bacterias tienen una tasa de mutación baja para mantenerse en el ambiente para el que están óptimamente adaptadas) y, por otro lado, un cierto nivel de variación genética les permite conquistar nuevos ambientes. Este equilibrio de fuerzas es la clave de la evolución y la supervivencia (2). Cualquier situación de estrés para la bacteria (falta de nutrientes, luz ultravioleta, antibióticos, etc.) rompe este equilibrio e incrementa la tasa de mutación.

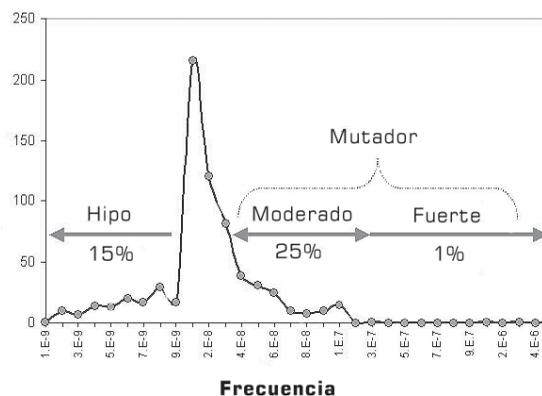
Los dos principales mecanismos que incrementan la tasa de mutación son aquéllos que afectan la replicación (el sistema ¿SOS?) y la reparación de ADN (el sistema ¿MMR? o sistema de reparación de emparejamientos erróneos) (3). El sistema SOS se induce cuando existe un daño en el ADN (4, 5) y el sistema MMR es el encargado de reconocer y reparar las bases mal emparejadas, durante la replicación (6, 7). Aquellas cepas defectuosas en alguno de los genes implicados en este último sistema tienen, simultáneamente, incrementada la tasa de mutación y de recombinación homóloga, lo que permite un mayor intercambio genético, incluso entre especies alejadas (8). Por ello, el sistema MMR ha sido implicado en los procesos de especiación bacteriana (9). Así pues, las bacterias con alta tasa de mutación o alta tasa de recombinación están en un proceso acelerado de variación, que les puede permitir la adaptación continuada a un ambiente cambiante. Como escribió Lewis Carroll, acerca de la Reina Roja, en el libro *Alicia en el país de las maravillas*, "Hay que correr mucho, para estar siempre en el mismo sitio".

## IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS CEPAS QUE MUTAN

La frecuencia modal de mutación de una población bacteriana es  $1 \times 10^{-8}$ , aproximadamente, es decir, que hay una base errónea que no se corrige por cada 100 millones de bases que se replican (10). Esta frecuencia de mutación, que es muy similar en diferentes especies bacterianas, refleja el equilibrio óptimo entre mutación y reparación, entre cambio y conservación del ADN cromosómico. Cualquier incremento significativo en la frecuencia de mutación en una especie bacteriana, respecto a la tasa de mutación modal de esa misma especie, dará origen a una cepa que muta (11-13) (figura 1). Si el incremento es moderado (5 a 50 veces), hablamos de cepas que mutan débilmente y, si el incremento es aún mayor (más de 50 veces), hablamos de cepas con alta tasa de mutación.

**Figura 1**

### Frecuencia de mutación



**Distribución de la frecuencia de mutación de una población natural de *Escherichia coli*.** La tasa de mutación modal corresponde a las bacterias con una tasa de mutación constitutiva ( $1 \times 10^{-8}$ ). Las bacterias con valores superiores son las que mutan. Las bacterias que mutan débilmente presentan una tasa de mutación de  $5 \times 10^{-8}$  a  $4 \times 10^{-7}$ ; los valores superiores corresponden a las bacterias que mutan fuertemente (Baquero, 2004).

**En la naturaleza.** Las primeras aproximaciones teóricas sobre la frecuencia de cepas que mutan en una población bacteriana la estimaban entre  $3 \times 10^5$  y  $5 \times 10^4$  del total de la población (14, 15). Sin embargo, como muestra la figura 1, la frecuencia de cepas que mutan en las poblaciones naturales de *E. coli* es mucho mayor de lo esperado, lo que sugiere que existe una presión selectiva favorable sobre cepas que mutan en diferentes ambientes. Varios estu-

dios coinciden en que las cepas con alta tasa de mutación constituyen ~1% de las poblaciones naturales, tanto en bacterias aisladas en diferentes procesos patológicos como en bacterias comensales (16-18). Esta proporción puede incrementarse drásticamente en procesos infecciosos crónicos, como en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (19), *Haemophilus influenzae* (20) y *Staphylococcus aureus* (21), aisladas del pulmón de pacientes con fibrosis quística, o en las cepas de *Helicobacter pylori* (22) aisladas de los pacientes con dispepsia.

¿Cuál es la razón del incremento en la proporción de cepas con alta tasa de mutación en algunas circunstancias? Como hemos mencionado anteriormente, todos los microorganismos tienen una tasa de mutación similar, denominada tasa de mutación constitutiva, de ~0,003 mutaciones por genoma por ciclo de replicación (10). Probablemente, esa tasa de mutación genera suficiente diversidad genética cuando la población es grande; sin embargo, en aquellas situaciones en las que el número de miembros de una población es bajo (como en las primeras etapas de una infección), la tasa de mutación constitutiva no es suficiente para generar la diversidad genética que garantice la supervivencia. En esas circunstancias, un incremento en la tasa de mutación garantizaría el número suficiente de variantes en la población para enfrentarse a posibles cuellos de botella en la adaptación (3), ya que la probabilidad de generar mutantes mejor adaptados a un nuevo ambiente (mutación ventajosa) depende de la capacidad de producir diversidad. Por tanto, en condiciones de estrés, la evolución selecciona las mutaciones ventajosas en un determinado ambiente e, indirectamente, el mecanismo que permite generar las mutaciones ventajosas (23) (selección de segundo orden o fenómeno de *hitch-hiking*).

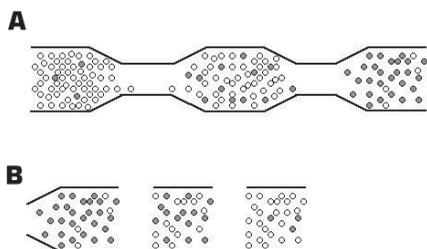
Ahora bien, si las bacterias con mayor tasa de mutación tienen mayor probabilidad de supervivencia en ambientes cambiantes, particularmente cuando la población es reducida, ¿por qué no todas las cepas mutan? Si partiéramos de una población en la que todos los integrantes tuvieran una alta tasa de mutación, en cada ciclo replicativo se acumularían mutaciones al azar en todo el cromosoma, lo que podría afectar genes esenciales y conducir a la muerte, que constituiría el costo biológico máximo de mutar. Se estima que, en 40 ciclos de replicación, 4% de la población que muta habría muerto, un 55% tendría

auxotrofías y 70% tendría defectos en alguna ruta catabólica (24). Por el contrario, una cepa con una tasa de mutación normal sólo tendría 3% de mutaciones detectables en todo el cromosoma después de 40 ciclos de replicación (24). Por tanto, el éxito evolutivo de una población bacteriana requeriría la presencia simultánea de miembros de la población con altas tasas de mutación y miembros con bajas tasas de mutación. Esta población mixta permitiría que, una vez superado el cuello de botella, los miembros con altas tasas de mutación pudiesen recombinar eventualmente con bacterias con bajas tasas de mutación, evitando así la acumulación de mutaciones deletéreas (25).

**En el laboratorio.** Numerosos estudios (26, 27) han demostrado que las bacterias con altas tasas de mutación se pueden seleccionar en el laboratorio. Esta subpoblación se enriquece como consecuencia de sucesivas situaciones estresantes que supongan un cuello de botella para el conjunto de la población bacteriana. Sucesivos cuellos de botella incrementan la proporción de bacterias que mutan hasta prácticamente el 100% de la población (26) (figura 2), en un proceso acelerado por el fenómeno de selección de segundo orden (27). Si el ambiente permanece estable durante mucho tiempo, la proporción de cepas que mutan comienza a disminuir a favor de la población que no muta (28), principalmente por: 1) acumulación de mutaciones deletéreas en la población que muta por deriva genética (24, 29) y 2) por procesos de recombinación en la población entre poblaciones que mutan y las que no lo hacen (30), restituyendo el gen defectivo implicado en la alta tasa de mutación en la cepa que muta.

Por otra parte, si el tamaño de la población es grande y la adaptación bacteriana baja, las cepas que mutan presentan una alta probabilidad de encontrar simultáneamente varias mutaciones beneficiosas diferentes. Estas variantes competirán entre sí en un proceso denominado "interferencia clonal" (31). El fenómeno de la interferencia clonal incrementa la posibilidad de la evolución adaptativa, ya que en la población se establecerán antes aquellas mutaciones beneficiosas que disminuyan menos la competencia (*fitness*) de la bacteria que las porta (32).

**Cepas que mutan transitoriamente.** Cuando una bacteria se encuentra en fase estacionaria de

**Figura 2**

**Representación esquemática de la teoría del cuello de botella (bottleneck).** A). Diferentes situaciones estresantes para la población bacteriana suponen progresivamente un enriquecimiento de la población que muta, hasta llegar a ser prácticamente población única, en pocos cuellos de botella. B) Sin embargo, los ambientes estables durante mucho tiempo reversion progresivamente el proceso hasta que la población con tasa de mutación constitutiva desplaza a la población que muta.

crecimiento, fase muy frecuente en la naturaleza, la expresión de los genes de reparación de malos emparejamientos disminuye y, como consecuencia, se acumulan errores; sin embargo, cuando la bacteria entra de nuevo en una fase de crecimiento exponencial, la expresión de estos genes vuelve a incrementarse (33, 34).

Este sería un caso de tasa elevada de mutación transitoria y natural. Por otra parte, las bacterias con tasa elevada de mutación que son estables, como consecuencia de una pérdida absoluta de la expresión de uno de los genes de reparación (bien por eliminación o interrupción del gen o simplemente mutación puntual), tienen mayor flexibilidad para intercambiar material genético, incluso con especies evolutivamente divergentes (pérdida de la barrera genética de especie) (8, 35).

Según los trabajos de Rosenberg *et al.* (33) y Harris *et al.* (36), la mayoría de la subpoblación bacteriana con tasas de mutación incrementadas responden al fenotipo transitorio y sólo una minoría son cepas con alta tasa de mutación *estables* o *heredables*, como los definen estos grupos.

### ESTUDIOS DE POBLACIÓN: LA IMPORTANCIA DE LAS CEPAS QUE MUTAN DÉBILMENTE

En diferentes estudios de población, la frecuencia de cepas con alta tasa de mutación permanece cerca del 1%. Sin embargo, el porcentaje de cepas clasificadas como aquellas que mutan débilmente oscila entre 11%, en cepas procedentes de las heces de

voluntarios sanos, y 38%, en cepas procedentes de bacteriemias (18, 37); incluso este porcentaje es superior en otras series como en poblaciones bacterianas portadoras de BLEE (Beta lactamasas de espectro extendido) (Baquero *et al.*, sometido para publicación).

Utilizando un modelo experimental, se ha sugerido que cuando el ambiente cambia cada 1.000 generaciones (~40 ciclos de replicación), más del 90% de la población podría llegar de las que mutan débilmente (38). Pueden alcanzar una alta proporción ya que, en presencia de una densidad de población suficiente, generan suficiente variabilidad genética como para permitir a la población adaptarse a los cambios ambientales con un costo menor, que si se tratase de bacterias con alta tasa de mutación (39). La frase de Charles Darwin "*Las especies que sobreviven no son las más fuertes, ni las más rápidas, ni las más inteligentes; son simplemente las que se adaptan mejor*" encaja perfectamente con el concepto de cepas que mutan débilmente.

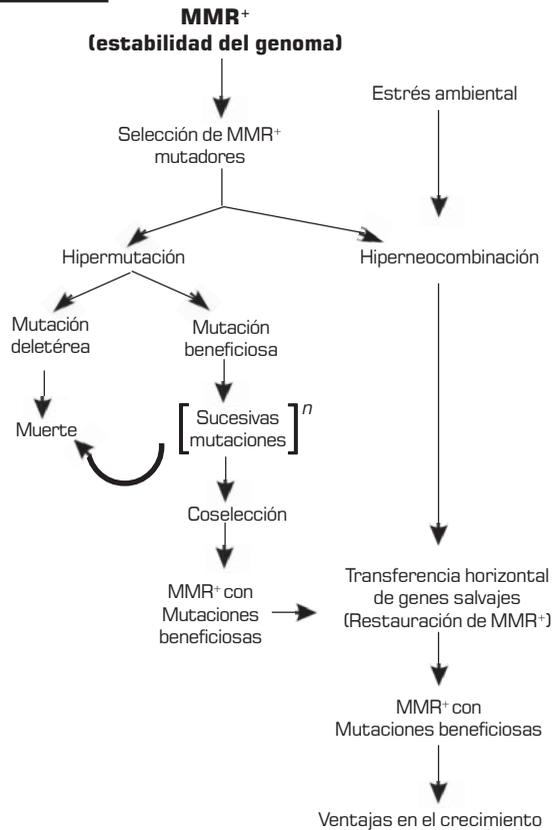
En la figura 3 se representa de manera esquemática lo que hasta ahora se ha discutido sobre el papel que juegan las cepas que mutadores (débil o fuertemente) en la evolución bacteriana.

### CEPAS QUE MUTAN Y EMERGENCIA DE BACTERIAS RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS: DETECCIÓN EN EL LABORATORIO

La emergencia de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos es un grave problema para la salud pública, debido a las limitadas opciones terapéuticas en algunos procesos infecciosos. La alta tasa de mutación de algunas cepas incrementa la probabilidad de encontrar aquella mutación beneficiosa que le permita sobrevivir y diseminarse en el ambiente y que es letal para aquellas otras bacterias que no encuentren, por azar, la mutación beneficiosa (41-43).

De este modo y después de varios ciclos de replicación, la población resistente será la mayoritaria y, como consecuencia de la selección de segundo orden, la mayoría de esta subpoblación será de las que mutan. Diversos estudios *in vitro* han demostrado que la aparición de mutantes resistentes a determinados antibióticos puede llegar a ser de 100 a 1.000 veces superior cuando se emplean cepas con alta tasa de mutación (44, 45). Además, según el gen

**Figura 3**



**Esquema-resumen adaptado de Dzidic et al.<sup>40</sup> de las características evolutivas de las bacterias con alta tasa de mutación.** En esta figura puede observarse cómo el estrés ambiental favorece la selección y el enriquecimiento de bacterias que mutan hasta la posible restauración del sistema MMR. Las mutaciones sucesivas constituyen la diferencia evolutiva entre bacterias que mutan fuertemente y bacterias que mutan débilmente. Cuanto mayor sea el valor de  $n$  (bacterias que mutan fuertemente), más intensa será la vía que conduce a la muerte, mientras que, en las bacterias que mutan débilmente, el valor  $n$  será menor y, por tanto, hay mayor la probabilidad de supervivencia a largo plazo.

implicado en el fenotipo que mute, la concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de los mutantes resistentes obtenidos puede ser diferente; así, en el trabajo de Miller *et al.* (44), si la bacteria tiene un defecto en el gen *mutT*, el 20% de los mutantes tendrán, en un solo paso, un incremento de 8 veces la CIM a ciprofloxacina; si la bacteria tiene un defecto en *mutS*, el 70% de los mutantes tendrá un incremento de 8 veces la CIM, y si el defecto es en *mutD*, el 100% de los mutantes tendrá una CMI 8-16 veces superior a la cepa de la que derivaron.

Giraud *et al.* (46), mediante un modelo animal, cuantificaron el impacto de las poblaciones bacteria-

nas con alta tasas de mutación sobre la aparición de cepas resistentes y el consiguiente fracaso terapéutico. En ratones colonizados por cepas que no mutan (o, en sentido estricto, con tasas de mutación constitutiva), se observó 16% de fracaso cuando el tratamiento se hizo con un solo antibiótico, pero, cuando el tratamiento se instauró con dos antibióticos, no se detectó ningún fracaso en el tratamiento. Sin embargo, estos valores oscilaron entre 70% y 100% con las cepas que mutan, según la combinación de antibióticos utilizada.

Recientemente, otros grupos han descrito resultados similares (47), en modelos que simulaban infecciones del tracto genitourinario. Estos autores concluyen que sería deseable realizar ensayos sencillos que permitieran determinar la presencia de cepas que mutan para evitar el uso de antibióticos a los que fácilmente se desarrollen resistencias, y reemplazarlos por antibióticos que tengan múltiples dianas letales y, en caso necesario, usar terapia combinada.

Nuestro grupo ha desarrollado un sencillo método para la identificación sistemática de bacterias con alta tasa de mutación en cepas procedentes de muestras clínicas (48). El ensayo consiste en contar las colonias que aparecen dentro de los halos de inhibición de la fosfomicina y la rifampicina, en una prueba de sensibilidad disco-placa, y establecer los puntos de corte que permitan discriminar las cepas con alta tasa de mutación de aquellas que tienen una tasa de mutación normal.

En los apartados anteriores, se ha revisado cómo las bacterias con alta tasa de mutación tienen mayor probabilidad de generar variantes de mutación resistentes a los antibióticos, que podrían seleccionarse durante la terapia y conducirían al fracaso terapéutico. Además, algunas familias de antibióticos podrían, bajo ciertas circunstancias, incrementar la tasa de mutación de las bacterias por inducción del sistema SOS bacteriano, que como es conocido, incrementa la tasa de mutación.

En este sentido, en el caso de las fluoroquinolonas (49), los aminoglucósidos (50) y los  $\beta$ -lactámicos (51, 52), esta relación ya se ha establecido. Otros grupos de antibióticos, como los macrólidos, pueden modular (inducir o reprimir) la expresión de 5%, aproximadamente, de los genes del cromosoma de *E. coli* (53), aunque aún no se ha establecido si entre ese porcentaje se incluyen genes del sistema SOS o MMR.

## USO DE CEPAS CON ALTA TASA DE MUTACIÓN PARA PREDECIR LA APARICIÓN DE VARIANTES RESISTENTES

Como venimos exponiendo, la presencia de una cepa que mute en la población bacteriana es una garantía de evolución acelerada (54). Esta característica puede ser explotada para numerosos fines. De hecho, se ha sugerido (55) el empleo de cepas con altas tasas de mutación para evaluar la facilidad con que se podrían desarrollar variantes resistentes a nuevos antibióticos, durante la terapia o en el medio ambiente.

Existen técnicas de mutagénesis muy eficientes para obtener gran variedad de mutantes con muy diferente espectro de actividad (56-58), pero la gran ventaja de emplear cepas que mutan para predecir la evolución (o simular una evolución acelerada) radica en que, al tratarse de un proceso natural (estas cepas existen en la naturaleza), se puede concluir que los mutantes obtenidos son el resultado evolutivo más probable.

Orencia *et al.* (59) comparan diferentes técnicas de evolución dirigida, entre ellas, el empleo de una cepa con alta tasa de mutación. Con facilidad obtienen, mediante diferentes técnicas, la variante TEM-52 (resistente a cefotaxima) partiendo de la  $\beta$ -lactamasa TEM-1 (3 cambios en la mutación).

En un trabajo previo de nuestro grupo (60), empleamos una cepa con alta tasa de mutación para obtener una variante resistente a la combinación de un  $\beta$ -lactámico con un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas en la  $\beta$ -lactamasa ACI-1, después de no haber obtenido ningún mutante empleando distintas estrategias con cepas que no mutaban.

Esta misma estrategia fue empleada para obtener variantes resistentes a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas o resistentes a cefotaxima de la  $\beta$ -lactamasa ROB-1 de *H. influenzae* (61), en la que no se han descrito estas variantes. Se obtuvieron fácilmente varios tipos de mutantes, tanto resistentes a cefalosporinas de tercera generación (ROB-BLEE), como resistentes a inhibidores (ROB-IR), por mutaciones puntuales; sin embargo, este incremento en la actividad de la  $\beta$ -lactamasa aumentaba drásticamente su susceptibilidad a cefaclor. De este modo, sugeríamos que, aunque en la naturaleza pudieran generarse este tipo de variantes, el uso alternativo de cefaclor y amoxicilina-clavulánico en la población evitaría que se pudieran seleccionar estos mutantes.

## CONCLUSIONES

La mutación es una de las claves de la evolución bacteriana. Sin embargo, se trata de un proceso altamente regulado, de tal manera que las bacterias tienden a mantener una baja tasa de mutación porque de lo contrario acumularían gran número de mutaciones, con la mayoría neutras o incluso deletéreas (y muy pocas ventajosas).

No obstante, en poblaciones bacterianas determinadas, se ha demostrado la presencia de cepas con tasas de mutación superiores a  $1 \times 10^{-8}$ . El porcentaje de estas cepas oscila entre 10% y 40%, en cepas que mutan débilmente (5-50 veces) y, aproximadamente, 1% y 30%, en cepas que mutan fuertemente (más de 50 veces).

Desde el punto de vista evolutivo, las cepas con altas tasas de mutación son la mejor garantía, y la mejor opción a corto plazo, para sobrevivir en un ambiente repentinamente letal; pero probablemente, a largo plazo, la mejor opción para la población es mantener una alta proporción de bacterias con moderada tasa de mutación (porque probablemente es equivalente tener muy pocos miembros en una población con alta tasa de mutación que muchos miembros con moderada tasa de mutación) que, además, puede recombinar fácilmente para corregir algún defecto genético que le suponga alguna desventaja en su tasa de crecimiento.

El interés del laboratorio de microbiología en la identificación de estas cepas radica esencialmente en el enorme potencial de estas bacterias para desarrollar mecanismos de resistencia antibiótica, lo que supone un alto riesgo de fracaso terapéutico. Es deseable que el laboratorio de microbiología no sólo identifique las poblaciones bacterianas resistentes a los antibióticos, sino que, además, sea capaz de detectar, a tiempo, aquellas poblaciones bacterianas que tienen alta probabilidad de llegar a ser resistentes. De esta manera, probablemente, se reducirían los casos de fracaso terapéutico.

Esta capacidad de algunas poblaciones bacterianas para desarrollar resistencia antibiótica también ha sido explotada como un modelo natural de evolución acelerada y nos permite predecir, en el laboratorio, la aparición de variantes resistentes a diferentes antibióticos. La explotación de esta ventaja pronóstica no sólo nos permite establecer la facilidad con la que determinadas variantes resistentes pueden aparecer ante una presión selectiva con-

creta, sino, además, establecer si la aparición de estas variantes tiene algún tipo de costo.

“Los microbios tienen la última palabra”, como lo afirmó L. Pasteur.

## REFERENCIAS

1. **STURTEVANT AH.** Essays on evolution. On the effects of selection on mutation rate. *Q Rev Biol.* 1937; 12:467-77.
2. **SNIEGOWSKI P, GERRISH P, JOHNSON T, SHAVER A.** The evolution of mutation rates: separating causes from consequences. *Bio Essays.* 2000;22:1057-66.
3. **BAYLISS D, MOXON ER.** Hypermutation and bacterial adaptation. *ASM News.* 2002;68:549-55.
4. **HERSH MN, PONDER RG, HASTINGS PJ, ROSENBERG SM.** Adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli*: two pathways of genome adaptation under stress. *Res Microbiol.* 2004;155:352-9.
5. **TENAILLON O, DENAMUR E, MATIC I.** Evolutionary significance of stress-induced mutagenesis in bacteria. *Trends Microbiol.* 2004;12:264-70.
6. **HORST JP, WU TH, MARINUS MG.** *Escherichia coli* mutator genes. *Trends Microbiol.* 1999;7:29-36.
7. **HUMBERT O, PRUDHOMME M, HAKENBECK R, DOWSON CG, CLAVERYS JP.** Homeologous recombination and mismatch repair during transformation in *Streptococcus pneumoniae*: saturation of the Hex mismatch repair system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:9052-6.
8. **MATIC I, TADDEI F, RADMAN M.** No genetic barriers between *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli* in SOS-induced mismatch repair-deficient cells. *J Bacteriol.* 2000;182:5922-4.
9. **SNIEGOWSKI P.** Mismatch repair: origin of species? *Current Biology.* 1998;8:R59-61.
10. **DRAKE JW.** Constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:7160-4.
11. **MILLER JH.** Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annu Rev Microbiol.* 1996;50:625-43.
12. **GIRAUD A, RADMAN M, MATIC I, TADDEI F.** The rise and fall of mutator bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2001;4:582-5.
13. **ARJAN J, DE VISSER GM.** The fate of microbial mutators. *Microbiology.* 2002;148:1247-52.
14. **BOE L, DANIELSEN M, KNUDSEN S, PETERSEN JB, MAYMANN J ET AL.** The frequency of mutators in populations of *Escherichia coli*. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen.* 2000;448:47-55.
15. **TENAILLON O, TOUPANCE B, LE NAGARD H, TADDEI F, GODELLE B.** Mutators, population size, adaptive landscape and the adaptation of asexual populations of bacteria. *Genetics.* 1999;152:485-93.
16. **LECLERC JE, LI B, PAYNE WL, CEBULA TA.** High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science.* 1996;274:1208-11.
17. **MATIC I, RADMAN M, TADDEI F, PICARD B, DOIT C ET AL.** Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 1997;277: 1833-4.
18. **BAQUERO MR, NILSSON AI, TURRIENTES M DEL C, SANDVANG D, GALÁN JC ET AL.** Polymorphic mutation frequencies in *Escherichia coli*: emergence of weak mutators in clinical isolates. *J Bacteriol.* 2004; 186:5538-42.
19. **OLIVER A, CANTÓN R, CAMPO P, BAQUERO F, BLÁZQUEZ J.** High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.* 2000;288:1251-4.
20. **WATSON ME, BURNS JL, SMITH AL.** Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology.* 2004;150:2947-58.
21. **PRUNIER AL, MALBRUNY B, LAURANS M, BROUARD J, DUHAMEL JF ET AL.** High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis.* 2003;187:1709-16.
22. **BJORKHOLM B, SJOLUND M, FALK PG, BERG OG, ENGSTRAND L ET AL.** Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:14607-12.
23. **TENAILLON O, TADDEI F, RADMAN M, MATIC I.** Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res Microbiol.* 2001;152:11-6.
24. **FUNCHAIN P, YEUNG A, STEWART JL, LIN R, SLUPSKA MM ET AL.** The consequences of growth of a mutator strain of *Escherichia coli* as measured by loss of function among multiple gene targets and loss of fitness. *Genetics.* 2000;154:959-70.
25. **BÜRGER R.** Evolution of genetic variability and the advantage of sex and recombination in changing environments. *Genetics.* 1999;153:1055-69.
26. **MAO E, LANE L, LEE J, MILLER JH.** Proliferation of mutators in a cell population. *J Bacteriol.* 1997;179:417-22.
27. **SHAVER AC, DOMBROWSKI PG, SWEENEY JY, TREIS T, ZAPPALA RM ET AL.** Fitness evolution and the rise of mutator alleles in experimental *Escherichia coli* populations. *Genetics.* 2002; 162:557-66.
28. **TRÖBNER W, PIECHOCKI R.** Competition between isogenic *mutS* and *mut+* populations of *Escherichia coli* K12 in continuously growing cultures. *Mol Gen Genet.* 1984;198:175-6.
29. **TANAKA MM, BERGSTROM CT, LEVIN BR.** The evolution of mutator genes in bacterial populations: the roles of environmental change and timing. *Genetics.* 2003;164: 843-54.
30. **BROWN EW, LECLERC JE, LI B, PAYNE WL, CEBULA TA.** Phylogenetic evidence for horizontal transfer of

- mutS* alleles among naturally occurring *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol.* 2001;183:1631-44.
31. **GERRISH PJ, LENSKI RE.** The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica.* 1998;102-103:127-144.
  32. **GERRISH PJ.** The rhythm of microbial adaptation. *Nature.* 2001;413:299-302.
  33. **ROSENBERG SM, THULIN C, HARRIS RS.** Transient and heritable mutators in adaptive evolution in the lab and in the nature. *Genetics.* 1998;148:1559-66.
  34. **FOSTER PL.** Are adaptive mutations due to a decline in mismatch repair? The evidence is lacking. *Mutat Res.* 1999;436:179-84.
  35. **MATIC I, BABIC A, RADMAN M.** 2-aminopurine allows interspecies recombination by a reversible inactivation of the *Escherichia coli* mismatch repair system. *J Bacteriol.* 2003;185:1459-61.
  36. **HARRIS RS, FENG G, THULIN C, ROSS KJ, SIDHU R ET AL.** Mismatch repair protein MutL became limiting during stationary-phase mutation. *Genes Dev.* 1997;11:2427-37.
  37. **MOROSINI MI, BAQUERO MR, SÁNCHEZ-ROMERO JM, NEGRI MC, GALÁN JC.** Frequency of mutation to rifampin resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical strains: *hexA* and *hexB* polymorphisms do not account for hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(4):1464-7.
  38. **TRAVIS JM, TRAVIS ER.** Mutator dynamics in fluctuating environments. *Proc R. Soc Lond B Biol Sci.* 2002;269:591-7.
  39. **TADDEI F, RADMAN M, MAYNARD-SMITH J, TOUPANCE B, GOUYON PH ET AL.** Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature.* 1997;387:700-2.
  40. **DZIDIC S, BACU-DRUZINA V, PETRANOVIC M.** The role of mismatch repair in bacterial evolution. *Food Technol Biotechnol.* 2003;41:177-82.
  41. **MARTÍNEZ JL, BAQUERO F.** Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:1771-7.
  42. **CHOPRA I, O'NEILL AJ, MILLER K.** The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drugs Resist.* 2003;6:137-45.
  43. **BLÁZQUEZ J.** Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis.* 2003;37:1201-9.
  44. **MILLER K, O'NEILL AJ, CHOPRA I.** Response of *Escherichia coli* hypermutators to selection pressure with antimicrobial agents from different classes. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49:925-34.
  45. **SCHAAFF F, REIPERT A, BIERBAUM G.** An elevated mutation frequency favors development of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3540-8.
  46. **GIRAUD A, MATIC I, RADMAN M, FONS M, TADDEI F.** Mutator bacteria as a risk factor in treatment of infectious diseases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:863-5.
  47. **MILLER K, O'NEILL AJ, CHOPRA I.** *Escherichia coli* mutators present an enhanced risk for emergence of antibiotic resistance during urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:23-9.
  48. **GALÁN JC, TATO M, BAQUERO MR, TURRIENTES C, BAQUERO F ET AL.** Fosfomycin and rifampin disk diffusion tests for detection of *Escherichia coli* mutator strains. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4310-2.
  49. **PHILLIPS I, CULEBRAS E, MORENO F, BAQUERO F.** Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J Antimicrob Chemother.* 1987;20:631-8.
  50. **BALASHOV S, HUMAYUN MZ.** Mistranslation induced by streptomycin provokes a RecABC/RuvABC-dependent mutator phenotype in *Escherichia coli* cells. *J Mol Biol.* 2002;315:513-27.
  51. **MILLER C, THOMSEN LE, GAGGERO C, MOSSERI R, INGMER H ET AL.** SOS response induction by  $\beta$ -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science.* 2004;305:1629-31.
  52. **PÉREZ-CAPILLA T, BAQUERO MR, GÓMEZ-GÓMEZ JM, IONEL A, MARTÍN S ET AL.** SOS-Independent Induction of *dinB* transcription by  $\beta$ -lactam-mediated inhibition of cell wall synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriology.* (en prensa).
  53. **GOH EB, YIM G, TSUI W, MCCLURE J, SURETTE MG ET AL.** Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:17025-30.
  54. **ITOH T, MARTIN W, NEI M.** Acceleration of genomic evolution caused by enhanced mutation rate in endocellular symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:12944-8.
  55. **CHOPRA I, O'NEILL AJ.** Use of mutator strains for characterization of novel antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1599-600.
  56. **ZACCOLO M, GHERARDI E.** The effect of high-frequency random mutagenesis on *in vitro* protein evolution: a study on TEM-1  $\beta$ -lactamase. *J Mol Biol.* 1999;285:775-83.
  57. **LONG-MCGIE J, LIU AD, SCHELLENBERGER V.** Rapid *in vivo* evolution of a  $\beta$ -lactamase using phagemids. *Biotechnol Bioeng.* 2000;68(1):121-5.
  58. **BARLOW M, HALL BG.** Experimental prediction of the natural evolution of antibiotic resistance. *Genetics.* 2003;163:1237-41.
  59. **ORENCIA MC, YOON JS, NESS JE, STEMMER WP, STEVENS RC.** Predicting the emergence of antibiotic resistance by directed evolution and structural analysis. *Nat Struct Biol.* 2001;8:238-42.
  60. **GALÁN JC, BAQUERO MR, REIG M, BAQUERO F, BLÁZQUEZ J.** Use of a mutator MutS<sup>-</sup> AmpC<sup>-</sup> *E. coli* host-strain to predict the appearance of clavulanate-resistant ACI-1  $\beta$ -lactamase in *Acidaminococcus*. 40<sup>th</sup> Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. Toronto, Canadá; American Society for Microbiology.
  61. **GALÁN JC, MOROSINI MI, BAQUERO MR, REIG M, BAQUERO F.** *Haemophilus influenzae* bla(ROB-1) mutations in hypermutagenic DampC *Escherichia coli* conferring resistance to cefotaxime and  $\beta$ -lactamase inhibitors and increased susceptibility to cefaclor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2551-7.