



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
I Z T A C A L A

CARACTERIZACION GENETICA PARCIAL DEL
BACTERIOFAGO FIZ15 DE Pseudomonas aeruginosa.

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G A

p r e s e n t a

FABIOLA ESTHER G. ENRIQUEZ ESPINOSA

Los Reyes Iztacala, Edo. de Méx.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICO ESTE TRABAJO A:

MIS PADRES Ignacio y Susana por
brindarme su apoyo y amor.

ALFONSO por todo lo maravilloso que me ha dado.

GRACIAS:

A mi asesor Sergio Vaca por la gran ayuda que me brindó para la terminación de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio: Ramón, Diego, Lupita, Andrés, Joceline, Froylan y Elias por la amistad y ayuda que me ofrecieron.

A mis amigos Miriam, Leonor, Carlos y Juan quienes siempre me infundieron ánimo para continuar.

Y a todas aquellas personas que tuvieron que ver con la realización de esta Tesis.

INDICE.

Introducción:	Página
Generalidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> en la naturaleza.....	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> en hospitales.....	2
Determinantes de virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
Bacteriófagos:	
Estructura.....	8
Composición química.....	9
Ciclos de vida.....	11
Titulación de un stock de fagos y morfología de las placas.....	16
Mutagénesis de Bacteriófagos y Bacterias.....	17
Elaboración de mapa genético.....	21
Cruzas líticas.....	21
Objetivos.....	23.
Material:	
Cepas.....	25
Soluciones y medios de cultivo.....	25
Metodos.....	27
Resultados.....	32
Discusión y conclusión.....	37
Bibliografía.....	43

INTRODUCCION.

GENERALIDADES DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Las *Pseudomonas aeruginosa* son bacterias gramnegativas, patógenas oportunistas, se caracterizan por ser aerobias estrictas, su tamaño oscila entre 0.5-1 micras de ancho por 1.5-4 micras de largo. Estas bacterias son móviles debido a la presencia de 1 a 3 flagelos polares. [Stanier *et al.*, 1975; Smith, 1980].

Pseudomonas aeruginosa EN LA NATURALEZA.

Las *Pseudomonas aeruginosa* se encuentran extensamente distribuidas en agua dulce, marina y en la superficie de plantas. Exámenes directos por microscopios electrónico y óptico han mostrado que estos organismos crecen en forma de microcolonias cubiertas por moco, encontrándose en la superficie de aguas dulces, marinas y en los suelos.

Se cree que el moco que presentan estas microcolonias las protege contra el ataque de bacteriófagos y amibas de vida libre encontradas en su habitat. [Costerton, 1979].

Investigaciones realizadas han demostrado que *P. aeruginosa* se encuentra frecuentemente, y a altas concentraciones, en suelos usados para macetas de plantas ornamentales, con una humedad relativa cercana al 90%, pero aún no es claro si *P. aeruginosa* se mantiene por sí misma en los suelos o es introducida por el agua, plantas o heces fecales de animales. [Rhame, 1979].

También se ha observado que las aguas de albercas tienen

regularmente un alto contenido de estas bacterias.

Se ha demostrado que *P. aeruginosa* crece en agua destilada, tal vez utilizando como nutrimentos a los gases disueltos en ella, obteniéndose 100 millones de bacterias en 48 horas a partir de un inóculo de 100 bacterias. En agua ultradestilada las *P. aeruginosa* mueren. [Rhame, 1979].

Pseudomonas aeruginosa EN HOSPITALES.

P. aeruginosa se caracteriza por su resistencia a un gran número de antibióticos en virtud de que la mayoría posee plásmidos responsables de la resistencia. [Cervantes-Vega *et al*, 1986; Chakrabarty, 1976; Holloway, 1974; Lowbury, 1974]..

Esta ventaja les permite prevalecer en ambientes hospitalarios, donde los antibióticos son ampliamente usados causando entre el 10 y el 20% de las infecciones de pacientes hospitalizados [Bodey *et al*, 1983; Olson *et al*, 1984] principalmente de aquéllos que sufren quemaduras [Pruitt, 1974; Rabin *et al*, 1961], fibrosis quística [Hoiby, 1977], leucemia [Frei *et al.*, 1965] o que han sido tratados con drogas inmunosupresoras [Reynolds *et al*, 1975].

Las fuentes de transmisión de estos microorganismos son el personal del hospital y los pacientes hospitalizados, ya que estas bacterias están presentes en el tracto intestinal [Rhame, 1979].

También incluyen las soluciones oftálmicas, soluciones antisépticas, jabón de hexaclorofenol, crema de manos, loción para el cuerpo, aparatos de succión, ventiladores respiratorios, incubadoras, plantas ornamentales, forceps, termómetros, navajas

de rasurar, batas y alimentos consumidos en el hospital [Rhame, 1979].

El agua destilada contaminada constituye un grave peligro como fuente de transmisión, ya que es utilizada para la preparación de múltiples soluciones, tales como detergentes, desinfectantes e incluso medicamentos [Smith, 1980].

DETERMINANTES DE VIRULENCIA DE *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa produce varias sustancias extracelulares que han sido relacionadas con su virulencia [Vaca *et al*, 1988]; entre éstas se encuentran: La exotoxina A, que es un polipéptido con un peso molecular de 66 Kd [Leppla, 1976] producido por un alto porcentaje de las cepas aisladas de pacientes [Pollack *et al*, 1977] y cuya acción es inhibir la síntesis de proteínas por ADP-ribosilación del factor de elongación 2 (EF-2) requerido para el paso de translocación durante la síntesis proteica [Pavloskis *et al*, 1974]. La exoenzima S, que es una proteína con actividad de ADP-ribosiltransferasa que contribuye a la virulencia de *P. aeruginosa*, ya que se ha demostrado que mutantes deficientes en la producción de esta enzima son significativamente menos virulentas que su cepa progenitora tanto en el modelo de ratón quemado (infección aguda), como en el modelo de infección crónica en rata [Nikas, 1987]. Una proteasa alcalina y una elastasa que han sido implicadas en la producción de hemorragias en órganos internos, especialmente en los pulmones y probablemente son las responsables de la destrucción del tejido corneal en infecciones oculares producidas por este microorganismo [Kawaharajo *et al*, 1974,

Kawaharajo *et al.*, 1975).

Aproximadamente el 85% de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* producen elastasa [Wretlind *et al.*, 1973] la cual es una proteasa neutra que contiene zinc y es sensible a quelantes de metales [Wretlind *et al.*, 1977] La elastasa purificada inactiva a los factores C1, C3, C5, C8 y C9 del complemento *in vitro*, por lo que quizá inhibe el movimiento de los leucocitos polimorfonucleares al sitio de inflamación y disminuye su actividad fagocítica [Schultz *et al.*, 1974] La elastasa también inactiva a la proteína α -1, el principal inhibidor de las serínproteasas endógenas [Moriyama *et al.*, 1979] (P. ej. de leucocitos) cuya actividad aumentada podría causar daño tisular.

Otra sustancia extracelular de *P. aeruginosa* es la leucocidina, una proteína de 27.5 Kd, termolábil y activable por tripsina, que destruye a los leucocitos, pero no a los glóbulos rojos [Scharman, 1976].

Este microorganismo produce también dos hemolisinas: un glicolípido termoestable y una fosfolipasa termolábil (fosfolipasa C), la cual es una proteína de 78 Kd que cataliza la hidrólisis de la fosfatidilcolina (el componente principal del surfactante pulmonar) en fosforilcolina y diacilglicerol. Se ha demostrado que la fosfolipasa C es muy activa sobre los fosfolípidos presentes en células eucarióticas (fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina y esfingomielina) y casi no tiene actividad sobre los fosfolípidos que forman parte de las membranas de las células procarióticas (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol) [Berka *et al.*, 1982].

Otro determinante de patogenicidad es la sustancia mucóide

que elaboran algunas cepas clínicas, particularmente las aisladas de pacientes con fibrosis quística [Zierdt *et al*, 1975]. Esta sustancia se conoce como alginato y es un exopolisacárido constituido principalmente por ácido manurónico y ácido gulurónico [Carlson *et al*, 1966]. El alginato inhibe las actividades fagocíticas de los leucocitos [Schwarzmann, 1971] y es capaz de producir efectos similares a los producidos por la infección de ratones con bacterias viables [Dimitracopoulos *et al*, 1980; Sensakovic *et al*, 1974]. El alginato también ha sido implicado en la adhesión de *P. aeruginosa* a células de tráquea de ratón [Ramphal *et al*, 1985].

Otro determinante de patogenicidad de *P. aeruginosa* es la movilidad, debida al flagelo, que facilita la invasión del hospedero por la bacteria [Montie *et al*, 1982]. Por otro lado, el 100% de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* son lisógenas y algunas de ellas son polilisógenas [Holloway *et al*, 1974]. La adquisición, por una bacteria, de nuevas características fenotípicas debido a la presencia de un profago (conversión lisogénica) ha sido bien estudiada en varios géneros bacterianos [Barksdale *et al*, 1974]. En *P. aeruginosa* se ha reportado que la lisogenización de la cepa PA01 (serotipo O:2a,d) por el bacteriófago D3, causa conversión lisogénica mediante la introducción de un grupo acetilo en la posición 4 de la fucosamina y el cambio en el enlace entre las unidades repetidas de trisacáridos de α -1-4 a β -1-4 [Kuzio *et al*, 1983]. Este cambio superficial, a nivel del antígeno O, que le causa el profago D3 a la cepa PA01, le confiere resistencia a la fagocitosis por macrófagos peritoneales de ratón *in vitro* y resistencia a la

superinfección por el fago D3, ésta última debida a que D3 es incapaz de adsorberse a la lisógena [Holloway *et al*, 1962].

Con el propósito de averiguar si los bacteriófagos contribuyen a la virulencia de *P. aeruginosa*, Vaca S. y colaboradores aislaron 210 bacteriófagos temperados a partir de cepas clínicas y construyeron las lisógenas correspondientes en la cepa PA01 (libre de fagos). Sólomente 80 fagos fueron capaces de formar lisógenas estables y distinguieron 19 tipos diferentes cuando probaron la inmunidad de las lisógenas a la superinfección por todos los fagos [Martínez *et al*, 1984]. Eligieron para estudio a uno de los 19 fagos debido a que su lisógena mostró un incremento de 4 veces en el título de aglutinación con antisuero, obtenido en conejos, dirigido contra la cepa PA01 muerta por calor, lo que sugirió que el profago FIZ15 le causó un cambio superficial a la lisógena a nivel de algún antígeno somático. Para determinar si el putativo cambio superficial inducido por FIZ15 estaba relacionado con algunas propiedades de virulencia, compararon a la cepa PA01 con PIZ15 en cuanto a: Adhesión a células bucoepiteliales humanas, sensibilidad al efecto bactericida del suero humano normal y sensibilidad a la fagocitosis por macrófagos peritoneales de ratón *in vitro*. La lisógena mostró una adhesión 1.5 veces mayor que PA01 a células bucoepiteliales humanas [Vaca *et al*, 1986]; una sobrevivencia 6 y 20 veces mayor al efecto bactericida del suero humano a concentraciones de 75% y 80%, respectivamente, y una sobrevivencia 2 veces mayor a la fagocitosis por macrófagos de ratón [Vaca *et al*, 1985].

Adicionalmente, la lisógena posee resistencia a estreptomocina (20 µg/ml, concentración letal para la no lisógena), un fenotipo

que hasta ahora no han explicado, pero que resulta muy útil para diseñar un método de selección de mutantes fágicas que ya no causen conversión lisogénica. También notaron que el fago FIZ15 es incapaz de formar placas en la cepa PA01 lisógena para el fago D3 e, igualmente, que D3 es incapaz de crecer en PIZ15, demostrando posteriormente que los fagos utilizan el mismo receptor y causan conversión lisogénica a nivel de éste. Para reforzar esta conclusión, aislaron una mutante espontánea de PA01 resistente a FIZ15c, (cepa PA01/15), la cual no permitió la adsorción de D3 ni de FIZ15. La mutante PA01/15 mostró una resistencia 2 veces mayor que PA01 a la fagocitosis; un aumento a la resistencia de 10 y 30 veces al efecto bactericida de suero humano a concentraciones de 75% y 80%, respectivamente y una adhesión a células bucoepiteliales 4 veces mayor que PA01 [Arce *et al*, 1987; Cruz *et al*, 1987; Vaca *et al*, 1988; Vaca *et al*, 1989]. Adicionalmente, una mutante espontánea de PA01 resistente al suero no permitió la adsorción de FIZ15 ni de D3 [Cruz *et al*, 1987; Vaca *et al*, 1988].

Los resultados anteriores muestran que la resistencia a la fagocitosis y al efecto bactericida del suero, así como el incremento en la adhesión a células bucoepiteliales que muestra la lisógena PIZ15, se deben al cambio superficial que el profago le causa a la lisógena a nivel del propio receptor para el fago, el cual parece residir en el antígeno O, toda vez que el fago D3 es antígeno O-específico [Vaca *et al*, 1987] y es incapaz de adsorberse a la lisógena PA01(FIZ15). Así pues, el fago FIZ15 le confiere a su lisógena importantes factores de virulencia.

BACTERIOFAGOS.

Los bacteriófagos son parásitos intracelulares obligados de bacterias. Su parasitismo es a nivel genético, ya que, dependen de la maquinaria biosintética celular para replicar y transcribir su DNA y para traducir los RNA mensajeros.

ESTRUCTURA:

Existen cerca de 2000 fagos que se han aislado y estudiado al microscopio electrónico, todos pueden clasificarse en los siguientes 4 grupos según su forma:

- Gpo 1- fagos con cola
- Gpo 2- " cúbicos o poliédricos
- Gpo 3- " filamentosos
- Gpo 4- " pleomórficos.

La forma y el tamaño de los fagos varían de un grupo a otro, pero al observarlos al microscopio electrónico todos presentan una estructura básica que puede ser poliédrica, también llamada cúbica.

La forma predominante de estructura poliédrica es el icosaedro con 20 caras triangulares y 12 vértices [Espejo, 1980].

También la cola puede variar en cuanto a tamaño y forma. La cola de los fagos T par es una estructura de gran complejidad que se encuentra formada por 4 componentes distintos: una vaina, un núcleo, una placa basal y 6 fibras de la cola, éstas últimas son órganos reales de adsorción, por medio de los cuales el fago

se ancla sobre la superficie de la célula huésped [Espejo, 1980].
(FIGURA 1.)

Los fagos que no poseen cola suelen tener pequeñas espículas ubicadas en los vértices del icosaedro. Los fagos filamentosos carecen de apéndices y parecen un cilindro, dentro del cual se encuentra el ácido nucleico en una cavidad helicoidal.

Tanto la cabeza como la cola de los fagos están formadas de una o varias clases de proteínas, sintetizadas por los mismos fagos, y que repetidas varias veces lo forman [Espejo, 1980].

COMPOSICION QUIMICA:

Los fagos están compuestos por un solo tipo de ácido nucleico, y nunca por ambos. Según el ácido nucleico que contengan se les denomina fagos de ADN o de ARN.

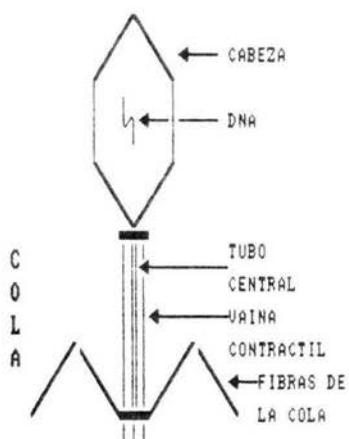
El ácido nucleico del fago contiene la información necesaria para la reproducción de éste, y se encuentra alojado en la cabeza, protegido por proteínas.

El ácido nucleico de los bacteriófagos ya sea ADN o ARN, puede ser monoténico (de una sola cadena) o biténico (doble cadena).

Algunos fagos presentan bases raras en vez de las encontradas comúnmente, los fagos T par no presentan citosina, y en su lugar contienen al análogo de la citosina; 5 hidroximetilcitosina [Davis, 1983].

Los fagos ϕ X174, 513 y M13 presentan un ADN monoténico helicoidal, su peso molecular oscila alrededor de 1.7 millones de Daltons y contienen alrededor de 5500 nucleótidos [Espejo, 1980].

FIGURA 1



REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL FAGO T4

Dentro del grupo de ARN biténico se encuentra el fago ϕ que infecta a *Pseudomonas phaseolicola*, contiene 3 moléculas de ARN con PM de 4.8, 2.9 y 2.2 millones de Daltones.. Una de las proteínas que forma la partícula tiene actividad de ARN polimerasa y es capaz de sintetizar ARN monoténico usando como molde el ARN biténico viral [Espejo, 1980].

CICLO DE VIDA DE LOS BACTERIOFAGOS:

Se han detectado 2 tipos de fagos en referencia a su ciclo de vida: los líticos y los temperados o lisogénicos. FIGURA 2.

El ciclo de vida lítico puede dividirse en 5 pasos secuenciales:

a) ADSORCION.- El fago se fija a la bacteria reconociendo receptores específicos en la superficie bacteriana.

Los sitios receptores están situados en la capa más externa de la pared formada por lipoproteínas y lipopolisacáridos.

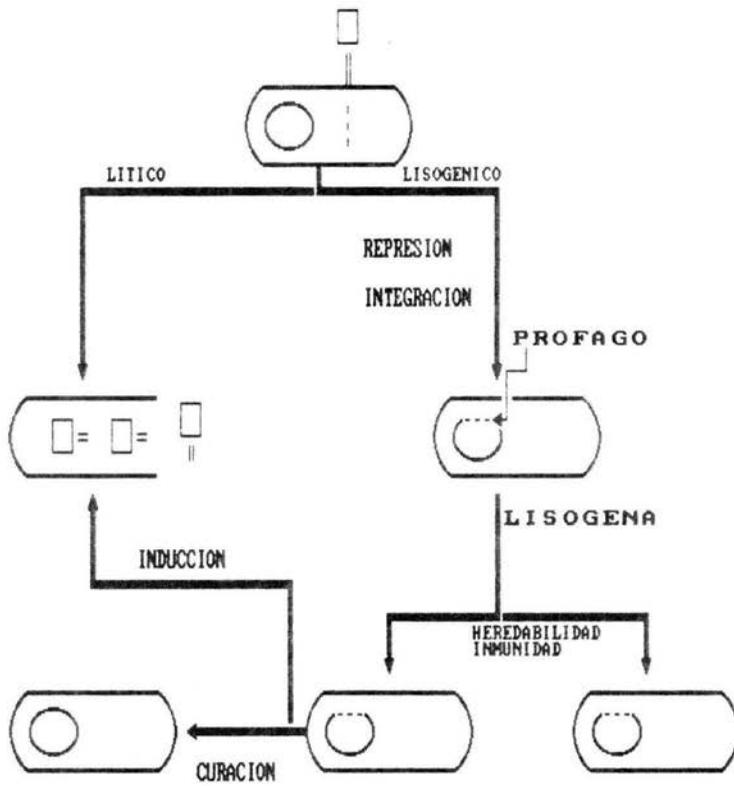
También puede haber sitios receptores en los flagelos y en los *pili* F presentes solo en bacterias *E. coli* F⁺.

El órgano de adsorción de los fagos está ubicado en la cola, los que no poseen cola presentan pequeños apéndices llamados espículas.

La célula bacteriana no parece tomar parte activa en la adsorción ya que la mayoría de los fagos pueden adsorberse en presencia de KCN, que inhibe los procesos metabólicos celulares, o en ausencia de metabolitos esenciales para el crecimiento de las bacterias, y aún más, son capaces de adsorberse a fragmentos

FIGURA 2

CICLOS DE VIDA DE LOS FAGOS



de la pared celular [Espejo, 1980].

b) INYECCION.- Una vez adsorbido el fago a la bacteria, introduce en ella el ADN (o ARND que contiene la información para la síntesis de su progenie.

En los primeros fagos que se estudió el mecanismo de la inyección fué en los T2 y T4, que están provistos de cola. El ADN pasa desde la cabeza del fago a través de la cola penetrando a la bacteria. La cola posee además una capa externa o vaina formada de una proteína contráctil, la contracción de esta vaina acaso impela el ADN desde la cabeza del fago al interior de la célula a lo largo de la cola [Espejo, 1980].

Durante el período en que el fago no es infeccioso se denomina fago vegetativo, y el lapso durante el cual no se encuentran partículas infecciosas en el interior de la célula se denomina período de eclipse.

c) ECLIPSE.- Durante este período, poco después de la inyección, la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas del huésped cesan [Stent, 1973] y el ácido nucleico del fago induce la síntesis de nuevas proteínas en la bacteria, conduciendo a la síntesis de componentes virales y su posterior ensamblaje para formar los fagos infecciosos [Espejo, 1980].

Casi todos los componentes bacterianos de la maquinaria de síntesis proteica participan en la producción de proteínas virales.

La biosíntesis del ácido nucleico viral requiere una fuente de energía así como precursores de bajo peso molecular, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos para ARN o ADN

respectivamente.

Varios experimentos han establecido que los fagos dependen de la bacteria huésped en cuanto al suministro de subunidades requeridas para la síntesis de polinucleótidos [Espejo, 1980].

d) MADURACION .- Consiste en el ensamblaje específico de los diversos componentes virales, para producir los fagos infecciosos. Estos componentes estructurales se unen mediante enlaces no covalentes y en una secuencia ordenada [Espejo, 1980].

e) LISIS.- Con la acción de enzimas líticas, presentes en los fagos, capaces de desintegrar la pared celular de las bacterias y provocando de esta manera la lisis, se liberan aproximadamente 100 nuevas partículas infecciosas [Espejo, 1980; Stent, 1973].

El ciclo de vida de un fago lisogénico o temperado es similar al lítico diferenciándose en que una vez inyectado su ácido nucleico puede permanecer circularizado en el citoplasma bacteriano o integrarse al cromosoma bacteriano [Stent, 1973.]. reproduciéndose en sincronía con el cromosoma bacteriano, solo una vez por cada generación de la bacteria.

En la lisogenia, fago y bacteria coexisten en armonía debido a que después de la inyección del ADN viral se reprime la expresión de los genes estructurales y de lisis por la acción de una proteína represora codificada por un gen fágico. El ADN reprimido de algunos fagos se integra al genoma bacteriano y se replica pasivamente como parte de éste, siendo heredado a las bacterias hijas [Lwoff, 1950].

El ADN viral reprimido se conoce como *profago*, la bacteria portadora como *lisógena*, y el proceso que conduce a la formación

de ésta como *lisogenización*.

Las lisógenas son inmunes a la superinfección por otro fago de la misma inmunidad, es decir otro fago que posea el (los) mismo (s) operador (es) . La inmunidad se debe a que en el interior de la lisógena hay siempre un exceso de proteína represora que se une al operador en el ADN del fago superinfectante reprimiendo la transcripción de sus genes.

La inmunidad conferida por un profago es *específica*, ya que la proteína represora codificada por éste solamente es capaz de reconocer una secuencia específica de nucleótidos (operador) exactamente igual a la del profago.

Una lisógena puede ser lisada dando origen a progenie viral cuando falla la represión, denominándose a este fenómeno *inducción*, ya que el profago es inducido al crecimiento lítico.

La inducción ocurre cuando la lisógena se expone a agentes físicos (luz ultravioleta, p.ej.) o químicos (mitomicina C, p.ej.) que dañan al ADN o interfieren con su replicación. La inducción del profago forma parte de una compleja serie de respuestas, conocida como sistema SOS, que presentan las bacterias ante situaciones que comprometen su sobrevivencia [Little y Mount, 1982].

En una población de lisógenas la represión falla espontáneamente a una baja frecuencia (aproximadamente 10^{-6}) [Echols 1979]. Esta característica se utiliza para confirmar que una bacteria es lisógena; para ello se detectan los bacteriófagos liberados por la formación de placas de lisis sobre un tapiz de una cepa sensible. Adicionalmente se determina la inmunidad de la lisógena a la superinfección, prueba que por sí sola sería no

conclusiva debido a que el bacteriófago "superinfectante" podría no lisar a la bacteria por que ésta careciera de receptor y no por la presencia de un profago, en cuyo caso la bacteria no sería inmune sino resistente. Desde luego, una cepa resistente no libera fagos.

Un bacteriófago capaz de lisogenizar (*temperado*) puede perder esta capacidad por mutación en uno o varios genes: el gen que codifica al represor, uno o dos genes necesarios para activar la transcripción del gen que codifica al represor, la secuencia de ADN que constituye el operador [Kaiser, 1957], el promotor a partir del cual se transcribe el represor.

TITULACION DE UN "STOCK" DE FAGOS Y MORFOLOGIA DE LAS PLACAS

La titulación es un procedimiento diseñado en 1917 por D'Herelle que permite contar el número de "unidades formadoras de placa" (u.f.p.) presentes en una suspensión; es decir, el número de fagos capaces de infectar productivamente a una bacteria sensible causando, cada uno de ellos, la aparición de una placa de lisis sobre un cultivo bacteriano que ha sido inmovilizado en agar. Generalmente el número de u.f.p. no es igual al número de partículas fágicas de la suspensión, debido a que una fracción de estas últimas es incapaz de infectar productivamente a causa de algún defecto estructural (p. ej. carencia, por pérdida, de las fibras de la cola o ruptura de la cápside).

Los bacteriófagos temperados producen placas de lisis turbias debido a que aproximadamente la mitad de las bacterias infectadas son lisadas y el resto son lisogenizadas; éstas últimas crecen en

el centro de la placa (son inmunes) dándole el aspecto turbio. Los fagos líticos producen placas claras (no lisogenizan).

Debido a que el fenotipo placa turbia depende de que ocurra represión de las funciones líticas y estructurales del fago, y para ello se requiere de la acción de varios genes virales, es posible obtener mutantes de placa clara, a partir de un fago temperado, cuyas mutaciones residan en diferentes genes (tantos como participen en la represión) [Kaiser, 1957]. Las mutantes afectadas en genes diferentes pueden distinguirse por complementación, la cual consiste en coinfectar bacterias con dos fagos mutantes obtenidos independientemente y averiguar si ambos fagos son capaces de reprimir las funciones líticas. Cuando se produce represión se dice que hubo complementación (uno de los mutantes carece de la función A pero posee la B y el otro posee ésta pero carece de aquélla; en el interior de la bacteria coinfectada están presentes ambas funciones y ocurre represión) y que los mutantes pertenecen a diferentes grupos de complementación. Si no hay represión, los mutantes pertenecen al mismo grupo de complementación, es decir, la mutación en cada uno de ellos afecta al mismo gene (una excepción a esta afirmación la constituye la no complementación entre un mutante afectado en un gene estructural, p. ej. el del represor, y otro mutante cuya mutación resida en el promotor a partir del cual se transcribe el represor).

MUTAGENESIS DE BACTERIOFAGOS Y BACTERIAS.

Tanto las bacterias como los fagos al igual que todos los

seres vivos, se caracterizan por su capacidad de transferir sus propiedades estructurales y funcionales a sus descendientes.

Los elementos que intervienen en la transmisión de los caracteres hereditarios se denominan genes, que son parte específica del ADN de células y de muchos virus.

Los genes se conservan normalmente y se copian sin alteración, pero, pueden ocurrir cambios o mutaciones en ellos..

Una mutación es un cambio, heredable o potencialmente heredable, no programado que altera la clase, secuencia o número de nucleótidos en el material genético de una célula u organismo.

Las mutaciones pueden originarse espontáneamente o ,ser inducidas por agentes mutagénicos (rayos UV, ácido nitroso, hidroxilamina, etilmetanosulfonato etc,), de los cuales solo se explicarán 2: El ácido nitroso produce la desaminación por oxidación de las bases aminosustituídas, convirtiendo la adenina en hipoxantina que se parece a la guanina, apareándose con la citosina en lugar de hacerlo con la timina, y la citosina es desaminada dando uracilo que se aparee con adenina en lugar de hacerlo con la guanina. FIGURA 3.

También el ácido nitroso puede producir enlaces cruzados, posiblemente por la producción de grupos aldehído, los cuales reaccionan con los grupos amino de la cadena opuesta [Davis *et al*, 1983].

El etilmetano sulfonato (EMS) es un agente alquilante, dando también lugar a transiciones a través de la alquilación de la guanina en posición 7N, que se aparee con timina en lugar de hacerlo con citosina [Davis *et al*, 1983]. FIGURA 4.

**FIGURA 3. DESAMINACION OXIDATIVA DEL DNA
POR ACCION DEL ACIDO NITROSO.**

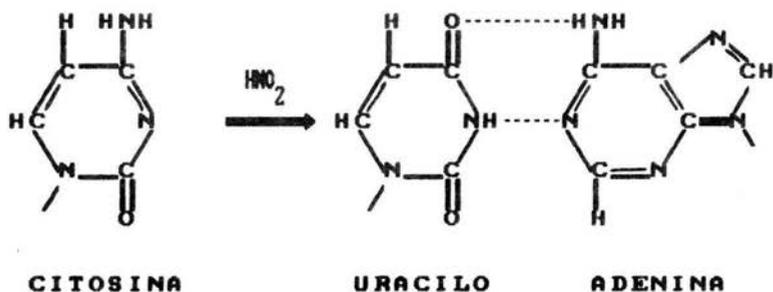
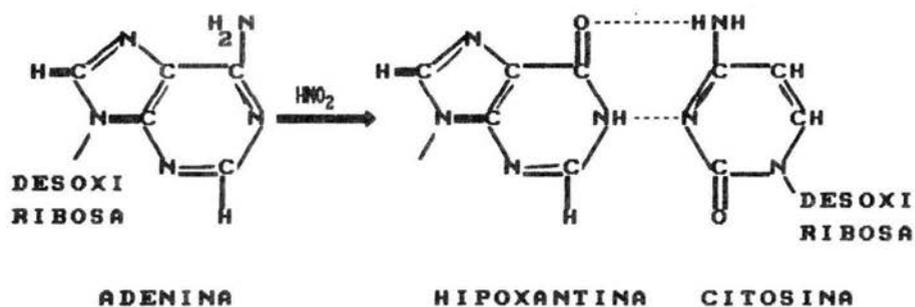
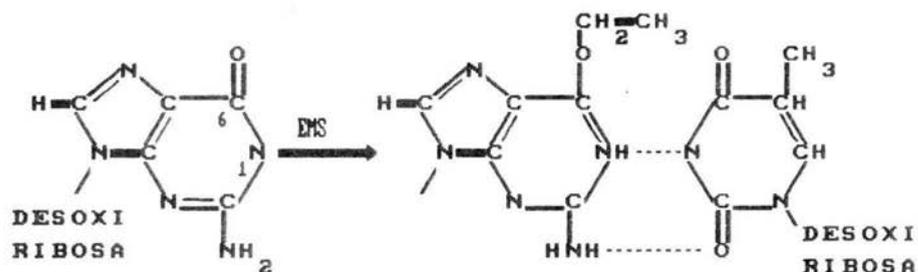
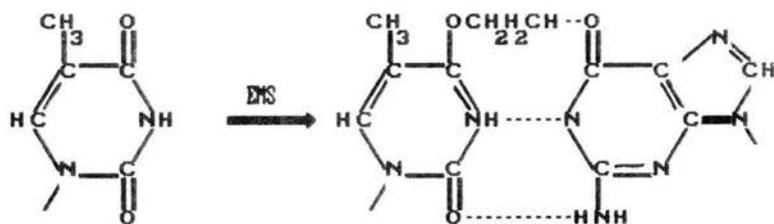


FIGURA 4. ALQUILACION DEL DNA POR ACCION DEL ETIL-METANO-SULFONATO (EMS).



GUANINA

6 ETILGUANINA TIMINA



TIMINA

4 ETILTIMINA GUANINA

ELABORACION DEL MAPA GENETICO

Un mapa genético contiene la posición, orden y distancias relativas de los genes en un cromosoma [Goodenough, 1978].

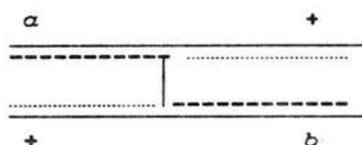
Para poder localizar las mutaciones en un cromosoma fágico es necesario obtener mutantes que posean algún marcador genético que permita distinguirlas del fago silvestre y entre sí. No cualquier mutación es útil como marcador genético para usarse con fines de localización de mutantes; sino que debe satisfacer varios requisitos:

- 1) El fenotipo mutante debe ser reproducible,
- 2) El mutante debe tener una baja frecuencia de reversión,
- 3) El fenotipo mutante debe estar dado por una sólo mutación
- 4) El mutante debe reproducirse tan eficientemente como el silvestre.

CRUZAS LITICAS

Una vez obtenidas las mutantes y diferenciadas por complementación, la elaboración del mapa genético puede realizarse mediante cruas líticas, en las cuales se coinfectan las bacterias con los dos mutantes cuyas mutaciones se desean localizar; después de permitir la adsorción de ambos fagos, se incuba el cultivo infectado para posteriormente lisar a las bacterias por adición de cloroformo permitiendo que se libere la progenie fágica. El lisado obtenido contiene a los fagos progenitores y a los recombinantes, que se titulan sobre una bacteria sensible y su proporción relativa se utiliza para estimar el porcentaje de recombinación, que es una medida de la distancia entre los marcadores [Goodenough, 1978].

Así por ejemplo, en la cruce :



Los progenitores son el mutante *a* y el mutante *b* y los recombinantes son el fago silvestre ++ y el doble mutante *a b*.

El % de recombinación es:

$$\% \text{ de Rec.} = \frac{\text{No. de recomb.}}{\text{fagos totales}} \times 100$$

Entre mas alejados se encuentren los marcadores mayor será su % de recombinación y viceversa.

Las cruces líticas pueden ser de uno dos y tres factores, dependiendo del número de marcadores genéticos implicados en ellas. P. ej. la cruce ejemplificada es de dos factores, participan los marcadores *a* y *b*.

OBJETIVO:

El objetivo de este trabajo fue iniciar la caracterización genética del bacteriófago temperado FIZ15 de *Pseudomonas aeruginosa* a través de:

- 1.- Obtención de mutantes deficientes en la represión de las funciones líticas (mutantes FIZ15c),
- 2.- Complementación de las mutantes FIZ15c,
- 3.- Localización de las mutaciones c mediante cruas líticas de dos factores, y
- 4.- Obtención de mutantes deficientes en la promoción de la conversión lisogénica.

Para cubrir los objetivos anteriores se mutagenizó al fago FIZ15 de *Pseudomonas aeruginosa* con ácido nitroso y se obtuvieron mutantes de placa clara, las cuales se distinguieron por complementación y posteriormente se localizaron las mutaciones mediante cruas líticas de dos factores.

Las mutantes deficientes en la promoción de la conversión lisogénica se obtuvieron mutagenizando a la lisógena PIZ15 (resistente a estreptomycin) con etilmetanosulfonato (EMS). Entre las sobrevivientes al tratamiento mutagénico se eligieron a las sensibles a estreptomycin (candidatas a poseer un profago incapaz de causar la conversión), se confirmó que continuaban siendo lisógenas por su capacidad de liberar fagos sobre un tapiz de la cepa PAO1. Se obtuvo el fago de cada una de las candidatas y se lisogenizó nuevamente a la cepa PAO1, se determinó si la nueva lisógena poseía uno de los fenotipos conferidos por el fago silvestre (incremento en la adhesión a células bucoepiteliales humanas). Desde luego, el fago mutante incapaz de causar conversión lisogénica ya no conferirá dicho fenotipo.

MATERIAL.

1. - CEPAS:

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que se emplearon para la realización de este trabajo fueron:

NOMBRE	CARACTERISTICAS	ORIGEN
PA01	<i>P. aeruginosa</i> protótrofa. libre de fagos.	Dr B. W. Holloway Monash University, Australia.
PIZ15	PA01 lisógena para el fago FIZ15	Lab. de Genética E. N. E. P. I.
PA0I/15	Mutante espontánea de PA01 resistente al fago FIZ15	Lab. de Genética E. N. E. P. I.

El bacteriofago que se utilizó en este trabajo fue el FIZ15 que causa conversión lisogénica a PA01.

2. - SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO:

Para la realización de este trabajo se emplearon los siguientes medios de cultivo y soluciones:

a) Caldo Nutritivo (C.N.).- 8 gr/ litro de C.N. Se esterilizó

b) Agar Nutritivo (A.N.).- 10 gr/litro de agar bacteriológico y 8gr/lt de caldo nutritivo. Se esterilizó

c) Agar Suave (A.S.).- 8gr/lt de caldo nutritivo y 6gr/lt de agar bacteriológico. Se esterilizó.

d) A.N. con Estreptomicina. - A.N. adicionado de estreptomicina a una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$. El antibiótico se disuelve en agua destilada estéril y la solución se esteriliza por filtración añadiéndose al medio estéril cuando éste se encuentra a una temperatura aproximada de 60° C.

e) Medio Mínimo (M.M.). - Mezclar KH_2PO_4 4.5 gr/lt, K_2HPO_4 10.5 gr/lt, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 gr/lt, citrato de sodio 0.5 gr/lt. Esterilizar y agregar 1ml de MgSO_4 1M y 10 ml de glucosa al 20%.

f) S.M. - Disolver 0.5gr de gelatina en 480.5 ml de agua destilada, agregar 5,85 gr de NaCl. Ajustar el pH= 7.4. Esterilizar y agregar 5ml de TRIS 1M pH= 7.4 y 2.5ml de MgSO_4 1M.

g) Solucion Amortiguadora Acida. - Mezclar 40 mM de MgSO_4 con 0.25M de acetato de sodio. Ajustar el pH= 4.25. Esterilizar.

h) TRIS. - TRIS 1M pH= 7.4

TRIS 0.2M pH= 7.5. Esterilizarlos.

i) PBS. - Pesar 2.55 gr de KH_2PO_4 , aforar a 125 ml, 20.1 gr Na_2HPO_4 , aforar a 500 ml, 4.25 de NaCl, aforar a 500 ml.

Tomar 60 ml, 380 ml y 440 ml respectivamente de las soluciones anteriores. Ajustar el pH= 7.2. Esterilizar.

NOTA: Todas las soluciones y medios de cultivo se esterilizaron a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada a 121° C.

METODOS:

1.- Obtencion de un Stock de Fagos FIZ15 y Titulación:

Se mezcló 0.5ml de bacteria PA01 crecida toda la noche en C.N. más una placa de fagos en 10 ml de C.N.. Se incubó a 37°C con agitación hasta lisis (4-5 hrs.). Se agregó 0.5 ml de cloroformo para completar la lisis, se volvió a incubar a 37° C con agitación durante 15 min. Se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 min. Se vació el sobrenadante a una jeringa estéril de 10 ml, previamente preparada con un filtro Millipore.

Para la titulación del stock se diluyó en S.M., de cada dilución se tomó 0.1 ml y se mezcló con 0.2 ml de PA01 crecida toda la noche, se permitió la adsorción durante 10 min.

Se agregó a cada tubo 3 ml de A.S. y se vació a cajas petri con A.N. Se incubó a 37° C durante 24 hrs. Se contaron las unidades formadoras de placas (UFP) de cada caja. Y se aplicó la siguiente fórmula para obtener el numero aproximado de fagos presentes en el stock:

$$\text{Título} = \frac{\text{UFP}}{\text{Dilución} \times \text{Volumen (ml)}} = \text{UFP/ml}$$

2.- Mutagénesis con Acido Nitroso (HNO₂) para la obtención de mutantes de placa clara y purificación de las mismas:

En un tubo estéril se mezcló en el siguiente orden 1.8 ml de solución amortiguadora ácida, 0.2 ml del stock del fago FIZ15 y

0.2 ml de nitrito de sodio (35 mg/ml en agua estéril), se agitó inmediatamente, se incubó a temperatura ambiente, se tomó de la solución mutagénica 0.1 ml a los 10, 20, 30, y 40 minutos, deteniendo la reacción a cada tiempo agregando 0.9 ml de S.M. mas TRIS 0.1M.

Se tituló por duplicado, se incubó a 40° C durante 24 hrs.

Para purificar las placas claras, se picaron con palillos esteriles, se rayó la caja petri con A.N y se le agregó 0.2 ml de bacteria PA01 mas 3 ml de A.S. moviendo la caja suavemente. Se purificaron las placas tres veces.

3.- Complementación de mutantes de Placa Clara:

En una caja petri con A.N. se agregó una gota de 10 microlitros de un stock de mutante clara con un título de 10^7 u.f.p./ml, se dejó secar y se agregó sobre esa misma gota otra gota de 10 microlitros de otra mutante con el mismo título que la anterior. Se incubó a 40°C durante 24 hrs. Si en la unión de las 2 gotas aparecen lisógenas (mancha turbia), los fagos mutantes pertenecen a diferentes grupos de complementación, de lo contrario (mancha clara), los fagos pertenecen al mismo grupo de complementación.

4.- Metodo de Recombinación de Fagos Mutantes de placa clara:

De la bacteria PA01 crecida toda la noche se tomó 0.2 ml y se agregó a 10 ml de C.N. se incubó a 37° C con agitación, hasta que

creció a una D.O. = 0.3, a 590nm (crecimiento exponencial).

Aparte en un tubo corex de 15ml se colocaron 200 millones de fagos/ml de una mutante clara, mas otros 200 millones de fagos/ml de otra mutante distinta de la primera, se agregó al tubo con los fagos 0.2 ml de cultivo de bacteria ya crecida a fase exponencial, se esperaron 20 min. para permitir la adsorción a temperatura ambiente, se agregaron 5 ml de C.N. y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. a 4° C, se resuspendió la pastilla en 10 ml de C.N., se incubó con agitación a 37° C durante 90 min. Se agregaron unas gotas de cloroformo, y se incubó nuevamente a 37° C durante 15 min., se diluyó en S.M. y se plaqueó en PA01 por duplicado, Se incubó a 37° C durante 24 hrs. Se contaron el número de placas totales y el número de placas recombinantes y se obtuvo el porcentaje de recombinación.

5.- Mutagénesis con Etilmetano Sufonato (EMS) [Miller, H.J., 1977] :

En 10 ml de M.M. se agregó una alícuota de 0.2 ml de PIZ15 crecida toda la noche en M.M. se incubó a 37° C con agitación hasta que creciera a fase exponencial..

Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. se resuspendió la pastilla en 4 ml de TRIS 0.2M pH= 7.5, se tiró el sobrenadante y se lavó la pastilla nuevamente con 4 ml de TRIS (3 veces). En un tubo con 2 ml de TRIS con la bacteria ya lavada se agregó 0.3 ml de EMS y se mezcló bien. Se incubó a 37° C con agitación durante 2 horas, se centrifugó y se resuspendió la pastilla en 2 ml de TRIS (2 veces). Se tomó 1 ml de la bacteria mutagenizada y se

agregaron 9 ml de C.N. , se incubó a 37° C con agitación durante toda la noche. Se diluyó con S.M. y se espatularon las diluciones en cajas petri con A.N. y se incubaron a 37° C durante 24 horas.

De las colonias aisladas crecidas en A.N. se picaron con palillos estériles en cajas con A.N y A.N.+ estreptomycin, se incubó a 37° C durante 24 horas, para averiguar cuáles fueron sensibles a estreptomycin.

Las bacterias sensibles a estreptomycin se crecieron toda la noche en C.N. y se obtuvieron, por centrifugación, los fagos liberados espontáneamente. Estos fagos se gotearon en PA01 y se obtuvieron sus lisógenas picando el centro de la placa con un palillo estéril y se sembraron en A.N.

6.- Medida de la adhesión bacteriana a células bucoepiteliales humanas.

a) Obtención de bacterias.

Se cultivaron las bacterias en agar de soya y tripticasa a 37°C durante la noche. Se cosecharon las bacterias de una caja de Petri en 4 ml de Tris 0.1M pH 7.0, se lavaron 3 veces con Tris y la suspensión se diluyó hasta obtener una D.O. de 0.25 a 590 nm.

b) Obtención de las células bucoepiteliales.

Las células bucoepiteliales humanas se obtuvieron de voluntarios (adultos sanos) por raspado del carrillo con isopos estériles, suspendiéndolas en 4 ml de Tris 0.1M pH 7. Se lavaron 3 veces por centrifugación con Tris y se ajustaron a una concentración de $2-5 \times 10^4$ células por mililitro después de contarlas en una cámara de Newbauer. La suspensión de células se trató con tripsina (2.5 µg/ml) por 10 min a 37° para eliminar la

fibronectina [Woods y Straus. 1981]. La tripsina se eliminó por lavados sucesivos con Tris 0.1M pH 7. y el paquete celular se resuspendió en Tris.

c) Adhesión *in vitro*.

Se mezclaron 2×10^6 bacterias con 5×10^4 células bucoepiteliales en 1 ml de Tris 0.1M pH 7 y se incubaron a 37°C y 20 rpm durante 2 h. La mezcla se lavó por centrifugación con Tris 5 veces para eliminar las bacterias no adheridas. En el segundo lavado se añadieron 2 gotas de eritrocina B. La mezcla se resuspendió en 1 ml de Tris y se tomó una gota para hacer un frotis que se fijó con calor para posteriormente teñirlo con azul de metileno durante 2 min. Se eliminó el exceso de colorante por lavado con agua destilada y las preparaciones se secaron al aire; finalmente se observaron al microscopio a 40 X y 100 X. Se contó el número de bacterias adheridas a 30 células bucoepiteliales viables. Se incluyó un control de células, sometidas al mismo procedimiento, a las que no se les agregaron bacterias, para determinar las bacterias indígenas presentes en la muestra de células.

RESULTADOS

OBTENCION DE MUTANTES DEFICIENTES EN LA REPRESION DE LAS FUNCIONES LITICAS.

Se mutagenizó al fago FIZ15 con ácido nitroso para obtener mutantes con fenotipo de placa clara. La tabla 1 muestra la frecuencia de aparición de mutantes de placa clara a diferentes tiempos. La frecuencia máxima se alcanza a los 20 minutos de tratamiento y disminuye a tiempos mayores, declinando a los 40 minutos. La frecuencia de aparición de mutantes espontáneas fue $<10^{-5}$.

TABLA 1
FRECUENCIA DE APARICION DE MUTANTES DE PLACA CLARA DEL BACTERIOFAGO FIZ15 POR TRATAMIENTO CON ACIDO NITROSO

T (MIN)	S/S ₀	FREC. DE CLARAS
0	1.0	$<10^{-5}$
10	0.82	$<6.1 \times 10^{-4}$
20	0.30	1.3×10^{-3}
30	0.18	1.1×10^{-3}
40	0.15	4.8×10^{-4}

Se purificaron tres veces nueve de las mutantes obtenidas; para ello se picó cada placa clara con un palillo estéril y se cruzó diametralmente una caja de petri conteniendo agar nutritivo, posteriormente se adicionó 0.2 ml de cultivo de PA01 con ayuda de 3 ml de agar suave, el cual se extendió cuidadosamente por toda la caja con el propósito de obtener placas aisladas después de incubar a 37°C toda la noche.

Una vez purificadas las placas de los fagos mutantes se hizo un

stock de cada uno de ellos, obteniendo títulos de 10^9 - 10^{10} u.f.p./ml.

COMPLEMENTACION DE LAS MUTANTES DE PLACA CLARA

Para averiguar si las mutantes pertenecían al mismo o a diferentes grupos de complementación, se realizaron coinfecciones por pares de mutantes, como se describe en material y métodos, observando si complementaban para represión (fenotipo de placa turbia). Las mutantes pueden agruparse en tres grupos de complementación: c1, c2 y c7. Así tenemos que en el grupo c1 sólo se obtuvo esa mutante; en el grupo c2 se obtuvieron, además de ésta, las mutantes c3, c4, c5 y c6 y en el grupo c7 se obtuvieron además c8 y c9. Estos resultados nos permiten concluir que el bacteriófago FIZ15 posee al menos tres genes necesarios para la represión de sus funciones líticas.

MORFOLOGIA DE PLACA DE LOS 3 FAGOS MUTANTES.

La mutante c1 tiene una morfología de placa completamente clara en tanto que la mutante c2 posee un pequeño punto turbio en el centro y la mutante c7 presenta un diminuto punto turbio central.

MAPEO DE LAS MUTACIONES c1, c2 Y c7 POR RECOMBINACION (CRUZAS DE DOS FACTORES).

Para determinar las distancias relativas entre las mutaciones c se realizaron cruzas de dos factores. Para ello se coinfectó a la cepa PA01 con los pares de mutantes, como se describe en Material y Métodos y se cuantificó la frecuencia de recombinación entre los marcadores. Como se muestra en la Tabla 2, y en la figura 5 los marcadores mas lejanos son c1 y c7 (separados por una

distancia de 0.1 unidades de recombinación), en tanto que c2 y c7 son los mas cercanos (0.037 unidades de recombinación) y la distancia entre c1 y c2 es de 0.076 unidades de recombinación.

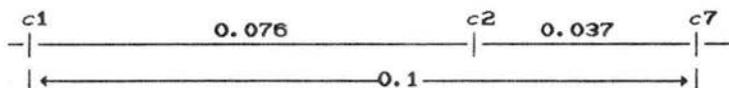
TABLA 2.
RECOMBINACION ENTRE LAS MUTANTES c1, c2 Y c7 DEL FAGO FIZ15

CRUZA	No. DE EXP.	% DE RECOMBINACION
c1 X c2	2	0.076
c1 X c7	2	0.1
c2 X c7	3	0.037

PA01 crecida hasta fase exponencial se infectó a $mdi=10$ con cada uno de los fagos progenitores en la cruza, se permitió la adsorción a temperatura ambiente, se eliminaron los fagos no adsorbidos por centrifugación, se agregó C.N., se incubó 90 min a $37^{\circ}C$ y la progenie de la cruza se plaqueó en PA01 para finalmente cuantificar los fagos progenitores (placas claras) y los recombinantes de placa turbia.

FIGURA 5

DISTANCIAS RELATIVAS DE LOS MARCADORES c1, c2 Y c7 DEL FAGO FIZ15



OBTENCION DE MUTANTES DEFICIENTES EN LA PROMOCION DE LA CONVERSION LISOGENICA.

Con el propósito de obtener mutantes fágicas deficientes en la promoción de la conversión lisogénica, mutagenizamos a la cepa

PIZ15 (resistente a estreptomina) con etilmetanosulfonato y elegimos, entre las bacterias sobrevivientes al tratamiento mutagénico, a aquellas sensibles a estreptomina. Confirmamos que estas candidatas poseían todavía al profago PIZ15 por su capacidad de liberarlo sobre un tapiz de la cepa PA01. A estas lisógenas las denominamos con1, con2, con3, con4 y con5. Debido a que la resistencia a estreptomina es un fenotipo conferido por el profago, la pérdida del mismo sugería que el gen viral responsable de la conversión lisogénica había sufrido una mutación. Por esta razón a las mutantes con se les midió la adhesión a células bucoepiteliales humanas. La tabla 3 muestra los resultados de los experimentos de adhesión.

TABLA 3
ADHESION DE LAS CEPAS PA01, PIZ15 Y DE LAS MUTANTES con DE
Pseudomonas aeruginosa A CELULAS BUCOEPITELIALES HUMANAS

CEPA	BACTERIAS POR CELULA*
--	1.18 ± 0.62
PA01	19.5 ± 1.3
PIZ15	29.1 ± 0.12
con1	18.4 ± 0.4
con2	57.0 ± 0.85
con3	17.6 ± 0.15
con4	15.3 ± 0.05
con5	19.1 ± 0.48

* Media ± Desviación estandar de dos experimentos.

Como puede observarse, las mutantes con se agrupan en dos categorías, las que muestran una adhesión similar a la de la cepa

PA01 (con1, con3, con4 y con5) y la con2, cuya adhesión se incrementa grandemente.

Para averiguar si la mutación con se localizaba en el genoma viral, se aisló el fago de cada una de las mutantes con, se hicieron los lisados correspondientes y se lisogenizó a la cepa PA01. A estas nuevas lisógenas se les denominó Gen. La tabla 4 muestra los resultados de adhesión de las lisógenas Gen a células bucoepiteliales humanas.

TABLA 4

ADHESION DE LAS CEPAS PA01, PIZ15 Y Gen DE
Pseudomonas aeruginosa A CELULAS BUCEOPITELIALES HUMANAS

CEPA	BACTERIAS POR CELULA*
--	0.64 ± 0.38
PA01	20.2 ± 1.1
PIZ15	29.1 ± 0.16
Gen1	19.4 ± 1.03
Gen2	38.2 ± 1.58
Gen3	18.7 ± 0.9
Gen4	17.9 ± 0.7
Gen5	18.8 ± 0.2

* Media ± Desviación estandar de dos experimentos.

Como puede observarse, las mutantes vuelven a formar dos grupos: Gen1, Gen3, Gen4 y Gen5 que muestran valores de adhesión similares a los de PA01 y Gen2, cuya adhesión es similar a la de PIZ15.

DISCUSION

Mutantes de placa clara del bacteriófago FIZ15.

Durante el desarrollo de este trabajo se obtuvieron tres mutantes diferentes del bacteriófago FIZ15 de *Pseudomonas aeruginosa* que le impiden reprimir las funciones líticas, confiriéndole por ello fenotipo de placa clara. La mas clara de ellas es la mutante c1 por lo que se puede suponer que esta mutación afecta al gen que codifica para el represor del fago, en tanto que las mutaciones c2 y c7 probablemente afectan a genes cuyos productos son necesarios para la transcripción del gen que codifica al represor, ya que ambas mutantes c2 y c7 si bien son claras, presentan un pequeño punto turbio en el centro, correspondiente a crecimiento de bacterias lisógenas, lo que implica que a baja frecuencia son capaces de producir represor y, en consecuencia, el gen que lo codifica no se encuentra mutado.

El fago temperado mas estudiado es λ de *Escherichia coli*. Las mutaciones de λ que le confieren deficiencia en represión se localizan en los genes cI, que codifica el represor, cII y cIII, que codifican proteínas necesarias para que se transcriba cI y, finalmente las mutaciones en cy, que afectan al promotor para el establecimiento de la represión [Kaiser, 1957; Echols y Green 1971]. Las mutantes cI de λ producen placas completamente claras, mientras que las mutantes cII y cIII producen placas claras con escaso crecimiento de lisógenas en el centro [Kaiser, 1957]. Así, para que el bacteriófago λ pueda lisogenizar a *Escherichia coli*, se requiere que ocurra el establecimiento de la represión por

transcripción del gen *cI* a partir del promotor *Pre*, situado en la región *cy*, para lo cual es necesaria la activación por las proteínas *cII* y *cIII*; una vez que se establece la represión, el mantenimiento de la misma se debe a la transcripción de *cI* a partir del promotor *Prm*, el cual no requiere activación por *cII/cIII*. El represor de λ se une a los operadores *O_L* y *O_R*, [Ptashne y Hopkins, 1968] bloqueando el acceso de la RNA polimerasa a los promotores *PL* y *Pr* y de este modo impide la transcripción de los genes estructurales y de lisis [Ptashne, 1971]. Para que las lisógenas de λ sean estables se requiere, además de la represión, que el profago se integre al cromosoma bacteriano.

Los procesos de establecimiento y mantenimiento de la represión por un fago temperado parecen ser similares para fagos diferentes. Así, en el bacteriófago D3 de *Pseudomonas aeruginosa* el establecimiento y mantenimiento de la lisogenia depende de la expresión de tres genes: *c1*, *c2* y *c3* [Egan y Holloway, 1961]; de éstos *c1* codifica al represor y *c2* y *c3* se requieren solo para el establecimiento de la represión.

Los fagos D3 y λ tienen varias características comunes: ambos son temperados y se integran en un sitio específico del cromosoma de *P. aeruginosa* y *E. coli*, respectivamente y son transductores especializados [Cavenagh y Miller, 1986]. Sin embargo, utilizan diferentes receptores y D3 no puede infectar a *E. coli* ni λ infecta a *P. aeruginosa*, tampoco sus DNAs muestran homología (ensayada por hibridización) y tienen mapas de restricción diferentes [Arber, 1983; Miller, et al., 1974].

A pesar de estas diferencias, ciertos procesos parecen ser

comunes; uno de ellos pudiera ser la represión, como queda ejemplificado al comparar λ con D3. Mas aún, se ha sugerido que λ y D3 probablemente evolucionaron a partir de un ancestro común, ya que el gen *ci* de D3 (que codifica al represor) clonado en un plásmido inhibe la multiplicación de D3 en las bacterias portadoras del plásmido que contiene a *ci* y la inducción de las lisógenas para D3 con luz ultravioleta; ambas inhibiciones son específicas puesto que el plásmido-*ci* no afecta la multiplicación ni la inducción con luz UV del fago F116L, también de *P. aeruginosa* pero de distinta inmunidad que D3 [Miller y Kokjohn, 1987]. El hecho de que el gen *ci* clonado de D3 inhiba estos procesos del fago D3 es lo esperado; lo sorprendente es que tanto la multiplicación de λ en una cepa de *E. coli* que contiene *ci* clonado en el plásmido pBR322, como la inducción del profago λ por luz UV en una lisógena portadora de pBR322-*ci* sean inhibidas también de modo específico (la inhibición no ocurre para λ imm434, un fago lambdaoide de distinta inmunidad) [Miller y Kokjohn, 1987]. Estos resultados han sido interpretados por Miller y Kokjohn como sugestivos de que λ y D3 evolucionaron a partir de un ancestro común y que si bien han divergido en muchos aspectos, conservan las similitudes funcionales de sus represores debido a que es ventajoso para estos fagos temperados capitalizar el potencial de la evolutivamente conservada proteína bacteriana RecA para monitorear el nivel de daño sufrido por el genoma bacteriano [Miller y Kokjohn, 1987] como consecuencia de la exposición a agentes físicos o químicos. De este modo, cuando una población de lisógenas está expuesta a agentes físicos o químicos que dañan al DNA o interfieren con su replicación, se dispara la respuesta SOS

[Little y Mount, 1982], mediante la cual una supuesta señal (quizá un oligonucleótido generado por los mecanismos bacterianos de reparación) activa a la proteína RecA (que también participa en recombinación) transformandola en una proteasa activa, capaz de degradar al represor LexA para que de este modo se transcriban los genes bacterianos que forman parte de la respuesta SOS, y cuya expresión está controlada por LexA, dando origen a los fenotipos asociados con ella (incremento en la capacidad de reparación, incremento en la mutagénesis, inhibición de la septación, inhibición de la respiración, incremento en la concentración celular de ATP,..). En estas condiciones, la proteasa RecA degrada también al represor del fago, induciendolo de este modo al crecimiento lítico.

Es probable que la regulación de la represión en el fago FIZ15 sea similar a la de λ y D3. En este trabajo se obtuvieron 3 mutantes diferentes de fenotipo placa clara, probablemente estas son análogas a las correspondientes en λ y D3. Incluso, el fago FIZ15 aparentemente utiliza el mismo receptor que D3 [Vaca et al., 1988] y ambos, D3 y FIZ15 disminuyen la sensibilidad de sus respectivas lisógenas a la fagocitosis por macrófagos peritoneales de ratón *in vitro* [Holloway y Cooper, 1962; Vaca et al., 1988]. No se sabe si D3 y FIZ15 son variantes del mismo fago aislados en diferentes lugares (el primero en Australia y el segundo en Iztacala) pero difieren al menos en una característica: ambos, cuando se encuentran como profagos, incrementan la adhesión de la cepa PA01 a células bucoepiteliales humanas, pero solo FIZ15 lo hace mediante un mecanismo dependiente de energía [Arce et al., 1987; Vaca et al., 1989].

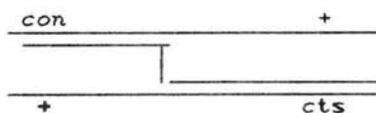
Mutantes de FIZ15 que ya no aumentan la adhesión de su lisógena.

Como se mencionó en la introducción, el bacteriófago FIZ15 al lisogenizar a la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* incrementa su adhesión a células bucoepiteliales humanas, confiriéndole también resistencia a estreptomycin. Con el propósito de obtener mutantes fágicas que ya no confieran este fenotipo de adhesión a la lisógena, se mutagenizó a la cepa FIZ15 y se eligieron mutantes sensibles a estreptomycin (mutantes *con*), para posteriormente medirles su adhesión a células bucoepiteliales humanas (Tabla 3). Las mutantes *con* se agruparon en dos categorías, las que mostraron una adhesión similar a la de la cepa PAO1 (*con1*, *con3*, *con4* y *con5*) y la *con2*, cuya adhesión se incrementa grandemente (Tabla 3).

Para averiguar si las mutaciones *con* se localizaban en el cromosoma viral o en el bacteriano, se obtuvieron los fagos de las lisógenas *con* y con ellos se lisogenizó a la cepa PAO, obteniendo las lisógenas *Gen*, a las cuales también se les midió la adhesión a células bucoepiteliales humanas (Tabla 4).

Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que para el primer grupo (*con1*, *con3*, *con4* y *con5*) la mutación responsable del fenotipo *con* se localiza en el genoma del fago FIZ15. La mutación *con2* parece residir en el cromosoma bacteriano y aparentemente tiene un efecto sinérgico con el (los) gene(s) fágico (s) responsable (s) del fenotipo de adhesión aumentada.

Para confirmar esta conclusión es necesario complementar las mutaciones *con*. Esto puede lograrse obteniendo, en primer término, dobles mutantes *con cts* por la siguiente recombinación:



Seleccionando placas claras sobre PA01 a 40°C, picándolas sobre PA01 a 30°C y eligiendo a aquéllas que no confieran resistencia a estreptomycin a las lisógenas del centro de la placa; o bien, seleccionando placas turbias a 30°C que confieran resistencia a estreptomycin y confirmando después que forman placa clara a 40°C.

Una vez obtenidas las dobles mutantes *con* *cts*, será posible coinfectar a PA01 utilizando pares de fagos *con1* *cts* y *con3*, por ejemplo, para obtener dobles lisógenas, confirmando que son tales por el hecho de que deberán liberar ambos tipos de fagos (uno de placa clara y otro de placa turbia a 40°C, ninguno de los cuales, cuando turbios, deberá conferir resistencia a estreptomycin). De este modo, si la doble lisógena posee resistencia a estreptomycin y muestra incremento en la adhesión a células bucoepiteliales humanas, ambos mutantes se complementan. En caso contrario, no complementan.

También sería necesario mapear las mutaciones *con* con respecto a las mutantes claras y con respecto a sí mismas.

Igualmente, sería necesario mapear la mutación *con2* por conjugación.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- ARCE, J. D. ARENAS, F. ARGUELLO & S. VACA. (1987). El bacteriófago FIZ15 aumenta la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas mediante un mecanismo que requiere energía. VII Coloquio de Investigación, ENEP Iztacala, UNAM, 23-27 de Noviembre.
- 2.- ARBER, W. (1983). A beginner's guide to lambda biology. En lambda II, Hendrix W., Roberts, J. W., Stahl, R. W. y Welsberg, R. A. (ed). Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 3.- BARKSDALE, L. & S. B. ARDEN. (1974). Persisting bacteriophage infections, lysogeny and phage conversions. Ann. Rev. Microbiol. 28: 265-290.
- 4.- BERKA, R.M. & M. L. VASIL. (1982). Phospholipase C (heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: purification and preliminary characterization. J. Bacteriol. 152: 239-245.
- 5.- BODEY, G. P. , R. BOLIVAR, FAINSTEIN & L. JADEJA. (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. 5: 279-313.
- 6.- CAVENAGH, M. M. & R. V. MILLER. (1986). Specialized transduction of *Pseudomonas aeruginosa* PAO by bacteriophage D3. J. Bacteriol. 165: 448-452.
- 7.- CARLSON D. M. & L. W. MATHEWS. (1966). Polyuronic acids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Biochemistry 5: 2817-2822.
- 8.- CERVANTES VEGA, et al. (1986). Antibiotic susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antoine Van Leewenhoek 52: 319-324.
- 9.- CHAKRABARTY, A. M. (1976). Plasmids in *Pseudomonas*. Ann. Rev. Genet. 10:7-30.
- 10.- COSTERTON J. W. (1979). *P. aeruginosa* in nature and disease. En *Pseudomonas aeruginosa* the organism diseases it causes and their treatment. Editado por L. D. Sabat, Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart Vienna. pp. 31-55.
- 11.- CRUZ H. A. , G. MARTINEZ & S. VACA. (1987). Resistencia al efecto bactericida del suero humano normal mediada por bacteriófagos en *Pseudomonas aeruginosa*. VII Coloquio de Investigación, ENEP Iztacala, UNAM, 23-27 de Noviembre.
- 12.- DAVIS B. et al. (1983). Tratado de Microbiología, 2 ed. , Salvat. España.
- 13.- DIMITRACOPOULOS G. & P. F. BARTELL. (1980). Slime glycoproteins and the pathogenicity of various strains of *Pseudomonas aeruginosa* in experimental infection. Infect. Immunum 30: 402-408.

- 14.- ECHOLS, H. & GREEN L. (1971). Establishment and maintenance of repression by phage lambda: the role of cI, cII and cIII proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 2190-2194.
- 15.- ECHOLS, H. (1979). Bacteriophage and Bacteria: Friend and Foe. The Bacteria, 7:487-516.
- 16.- EGAN, J. B. & B. W. HOLLOWAY. (1961). Genetic studies on lissogeny in *Pseudomonas aeruginosa*. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 39:9-18.
- 17.- ESPEJO R. T. (1980). Bacteriofagos. 2^a ed. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos.
- 18.- FREI E. R. et al. (1965). The nature and control of infections in patients with acute leukemia. Cancer Res. 25: 1511-1525.
- 19.- GOODENOUGH U. (1978). Genetics. Holt Rinehart and Winston. 2^a ed. USA.
- 20.- HOIBY N. (1977). *Pseudomonas aeruginosa* infection on cystic fibrosis. Acta Pathol. Microbiol. Scand Sect. C Suppl. 262
- 21.- HOLLOWAY B. H. (1974). Genetic organization of *Pseudomonas*. En: Clarke P. H. & M. H. Richmond (eds.), Genetics and Biochemistry of *Pseudomonas*, Wiley, London.
- 22.- HOLLOWAY B. H. & G. N. COOPER. (1962). Lysogenic conversion in *P. aeruginosa*. J. Bacteriol. 84:1321-1324.
- 23.- KAWAHARAJO K. et al. (1974). Corneal ulcers caused by protease and elastase from *P. aeruginosa*. Jpn. J. Exp. Med. 44:435-442.
- 24.- KAWAHARAJO K. et al. (1975). *In vivo* studies on protease and elastase from *P. aeruginosa*. Jpn. J. Exp. Med. 45:89-100.
- 25.- KUZIO J. & A. M. KROPINSKY. (1983). O-antigen conversion in *P. aeruginosa* PA01 by bacteriophage D3. J. Bacteriol. 155:203-212.
- 26.- LEPPLA S. H. (1976). Large-scale purification and characterization of the exotoxin of *P. aeruginosa*. Infect. Immun. 14:1077-1086.
- 27.- LOWBURY E. J. (1974). Ecological importance of *P. aeruginosa*: Medical aspects. En: Clarke P. H. & M. H. Richmond (eds), Genetics and Biochemistry of *Pseudomonas*, Wiley London.
- 28.- MARTINEZ H. G. et al. (1984). Aislamiento de bacteriófagos de cepas clínicas de *P. aeruginosa*. IV coloquio de Investigación, ENEP Iztacala, UNAM, 26- 30 Noviembre.
- 29.- MILLER, R. V. J., M. PEMBERTON & K. E. RICHARDS. (1974). F116, D3 AND G101 Temperate bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. Virology 59: 56-569.
- 30.- MILLER R. V. & T. A. KOKJOHN. (1987). Cloning and

characterization of the cI repressor of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage D3: a functional analog of phage lambda cI protein. J. Bacteriol. 169: 1847-1852.

31.- MILLER H. J. (1977). Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 138.

32.- MONTIE, T. C. et al (1982). Loss of virulence associated with absence of flagellum in an lisogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. Infect. Immun. 38: 1206-1208.

33.- MORIHARA K. et al. (1979). Protease and elastase of *Pseudomonas aeruginosa* inactivation of human plasma α -1 proteinase inhibitor. Infect Immun. 24- 188-193.

34.- NIKAS T. (1987). Genetic Approaches to the study of pathogenesis. 87 ASM annual meeting, 1-6 march, Atlanta, GA. USA.

35.- OLSON B. et al. (1984). Epidemiology of endemic *P. aeruginosa*: Why infection control efforts have failed. J. Infect. Dis. 150:808-816.

36.- PAVLOSIS O. R. & A. H. SHAKELFORD. (1974). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin in mice: localization and effect on protein synthesis. Infect. Immun. 9:540-546.

37.- POLLACK M. et al. (1977), Exotoxin production by clinical isolates of *P. aeruginosa*. Infect. Immun. 15:766-780.

38.- PRUITT B. A. (1974). Infection caused by *Pseudomonas* species in patients with burns and in other surgical patients. J. Infect. Dis. 130:58-513.

39.- PTASHNE, M. & HOPKINS, N. (1968). The operators controlled by the lambda phage repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 60: 1282-1287.

40.- PTASHNE, M. (1971). Repressor and its action. En: the bacteriophage lambda. A.D. Hershey (ed). Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp. 221-238.

41.- RABIN E. R. et al. (1961). *Pseudomonas* Infection in burned patients. A clinical bacteriologic and anatomic study. New Engl. J. Med. 265: 1225-1231.

42.- RAMPHAL R. & G. B. PIER. (1985). Role of *P. aeruginosa* mucoid exopolisaccharide in adherence to tracheal cells. Infect. Immun. 47:1-4.

43.- REYNOLDS H. Y. et al. (1975). *P. aeruginosa* infection persisting problems and current research to find new therapies. Ann. Inter. Med. 82:819- 831.

44.- RHAME F. S. (1979). The Ecology and epidemiology of *P. aeruginosa*. En: *Pseudomonas aeruginosa* the organism diseases it causes and ther treatment. Editado por L. D. Sabath, Hans Huber

Publishers, Bern Stuttgart Vienna. pp. 31-55.

45.- SCHARMAN W. (1976). Formation and isolation of leucocidin from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 93:283-291.

46.- SCHULTZ D. R. & K. D. MILLER. (1974). Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. Infect. Immun. 10:128-135.

47.- SCHWARZMANN S. & J. R. III BORING. (1971). Antiphagocytic effect of slime from a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 3: 762-767.

48.- SENSAKOVIC J. W. & P. F. BARTELL. (1974). The slime of *Pseudomonas aeruginosa*: biological characterization and possible role in experimental infection. J. Infect. Dis. 129:101-109.

49.- SMITH A. L. (1980). Fundamentos de Microbiología. 8^a ed. EUNSA. España. pp:557-559.

50.- STANIER R. Y. et al. (1975). General properties and taxonomy of genus of *Pseudomonas*. Genetics and biochemistry of *Pseudomonas*. Editado por P. H. CLARKE, M. H. RICHMOND, JOHN WILEY and SONS. pp. 1-37.

51.- STENT G. S. (1973). Genética Molecular. 1 ed. Edit. Omega España.

52.- VACA S., J. ESCOBAR, G. MARTINEZ, M. URZUA, A. CAMPOS, B. HASHIMOTO & C. CERVANTES. (1985). Aumento de la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* debido a bacteriófagos. XVI Congreso Nacional de Microbiología, Durango. Dgo. 11-15 de agosto.

53.- VACA S., G. OLIVER, J. ESCOBAR, G. MARTINEZ & D. ARENAS. (1986). Modificación de propiedades de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* inducida por el bacteriófago FIZ15. XVII Congreso Nacional de Microbiología, Puebla, Pue. 27-30 de Abril.

54.- VACA S., G. MARTINEZ, D. ARENAS, J. ARCE & G. OLIVER. (1987). El bacteriófago FIZ15 aumenta la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* al causarle un cambio superficial en el receptor para el fago. XVIII Congreso Nacional de Microbiología, Acapulco, Gro. 27-30 de Abril.

55.- VACA S., C. CERVANTES-VEGA, (1988). Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 30: 87-90.

56.- VACA S., G. MARTINEZ, A. CRUZ & J. ESCOBAR. (1988). Decreased sensitivity to phagocytosis and serum bactericidal effect induced by FIZ15 bacteriophage in *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 30:277-281.

57.- VACA S., J. ARCE, F. ARGUELLO, D. ARENAS & G. OLIVER. (1989). FIZ15 bacteriophage increases the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells. Rev. Lat-amer. Microbiol. 31:1-5.

58.- YACA S. , F. ARGÜELLO, D. ARENAS, R. MORENO & G. MARTINEZ. (1989). Potassium ions stimulate adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells. Rev. Lat-amer. Microbiol. 31:305-309.

59.- WRETLIND B., L. HEDEN, L. SJOBERG & T. WADSTROM. (1973). Production of enzymes and toxins by hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to serotype and phage typing pattern. J. Med. Microbiol. 6:91-100.

60.- WRETLIND B. & T. WADSTROM. (1977). Purification and properties of a protease with elastase activity from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 103:319-327.

61.- WOODS, D. . & D. C. STRAUS. (1981). Role of fibronectin in the prevention of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to buccal cells. J. Infect. Dis. 143: 784-790.

62.- ZIERDT C. H. & R. L. WILLIAMS. (1975). Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis of the pancreas. J. Clin. Microbiol. 1:521-526.