



77  
2y.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**CAMPUS IZTACALA**

**CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DEFICIENTES EN LA  
PROMOCIÓN DE LA CONVERSIÓN LISOGÉNICA**

**TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGA**

PRESENTA: P. DE B. MARÍA DE LOURDES MORA MUNGUÍA  
DIRECTOR DE TESIS M. EN C. RAMÓN V. MORENO TORRES

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1998  
260567



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.

A mi madre y mi hija:

Las dos mujeres más importantes de mi vida;  
Michelle, porque aun no me ha perdido la fé  
Milec porque a pesar de haberme perdido la-  
fé, me ama.

A Eduardo Arturo:

Con gratitud y amor por todo tu apoyo, tu disciplina  
y sobre todo porque nunca permitiste que flaqueara -  
mi voluntad...

AGRADECIMIENTOS:

A Dios... porque sin su voluntad nada sucede...

A Irma Elena y Laura por todo el apoyo y estímulo que me dieron en los momentos más difíciles...

A Ramón Víctor por su invaluable ayuda, guía y disposición durante todo este proceso...

A Elo. Beto y Lalo por su cariño, hospitalidad y aún apoyo económico irrestricto siempre que lo necesité...

A Betusi por su ayuda y asesoría con la computadora...

Y a todos aquéllos que facilitaron la elaboración de este trabajo y que no menciono, no por omitirlos, sino por falta de espacio...

¡ G R A C I A S !

## *RESUMEN*

*La conversión lisogénica es una propiedad genética estable que presentan las bacterias portadoras de bacteriofagos (fagos). Al integrarse en el genoma bacteriano, los fagos modifican las características genéticas de las bacterias modificando su fenotipo.*

*Se aislaron cepas de fagos deficientes en la promoción de la conversión lisogénica causada por FIZ 15 a su lisógena. El aislamiento se logró aprovechando como método de selección la pérdida de la resistencia a estreptomycinina por parte de la lisógena. Las cepas fágicas mutantes fueron caracterizadas en cuanto a la letalidad causada por un agente mutagénico, eclosión sencilla y liberación espontánea de fagos.*

*De las mutantes obtenidas se observa que una conserva propiedades similares a las de la cepa progenitora FIZ 15 y la otra mostró estas características relativamente diferentes. La caracterización de los bacteriofagos con base en la relación fago bacteria es una línea promisoría en el conocimiento de estos sistemas.*

## INDICE

1.1	GENERALIDADES	4
1.2	FACTORES DE VIRULENCIA	4
2.-	BACTERIOFAGOS	6
2.1	ESTRUCTURA	6
2.2	COMPOSICIÓN QUÍMICA	6
2.3	CICLOS DE DESARROLLO	7
3.-	LISOGÉNIA	8
3.1.	CONVERSIÓN LISOGÉNICA	8
3.2.	INDUCCIÓN	9.
4.	MÉTODOS DE ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN	10
4.1	TITULACIÓN	10
4.2	ECLOSIÓN SENCILLA	10
4.3	TASA DE LIBERACIÓN ESPONTÁNEA	10
4.4	TASA DE MUTACIÓN	11
5.	ANTECEDENTES	12
6.	OBJETIVOS	13
7.	MATERIAL Y MÉTODOS	14
7.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	14
7.1.1	CEPAS DE BACTERIAS	14
7.1.2	CEPAS DE FAGOS	14
7.2	SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	15
7.3	OBTENCIÓN DE LISADOS FÁGICOS	15
7.4	TITULACIÓN DE LISADOS FÁGICOS	15
7.5	MUTAGÉNESIS CON ÁCIDO NITROSO	16
7.6	MUTAGÉNESIS CON EMS	16
7.7	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE FAGOS	16
7.8	MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE LA CURVA DE ECLOSIÓN SENCILLA	16
8	RESULTADOS	17
9	DISCUSIÓN	22
10	CONCLUSIÓN	23
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>26</b>

## 1.1.- GENERALIDADES.

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gram-negativa patógena oportunista, capaz de causar daño en animales, plantas e insectos. En seres humanos podría producir septicemias en pacientes inmunodeprimidos, quemados y heridos, también es la causa de infecciones localizadas en oídos u ojos, de padecimientos crónicos en pacientes con fibrosis quística y de infecciones agudas en pacientes con neumonía por lo que el daño que produzca dependerá del estado de salud del hospedero (44). Rara vez causa septicemias en pacientes con fibrosis quística (17), aunque si es diseminada de pulmones infectados. *P.aeruginosa* produce el 10% de las bacteremias gram-negativas (3), el rango de mortalidad asociado con este germen (c.a. 50%) es superior al asociado con otras bacteremias gram-negativas (9). En hospitales se le ha encontrado en soluciones óticas, colirios, jabones, antisépticos, lavabos, material de cirugía y las manos del personal (10, 38) y debido a su gran capacidad metabólica Favero (1980)(14) reportó que es capaz de sobrevivir y multiplicarse en agua destilada.

## 1.2.- FACTORES DE VIRULENCIA.

Existen datos que indican que la virulencia de *P.aeruginosa* es multifactorial, de hecho este organismo produce gran cantidad de enzimas y toxinas, las cuales parecen contribuir a esta virulencia (24, 45), entre éstas se incluyen: dos proteínas ADP-ribosiltransferasas (toxina A y exoenzima S); una toxina extracelular (leucocidina) y dos hemolisinas (fosfolipasa C y ramnolípido).

Este organismo se caracteriza también por su alta resistencia a antibióticos, debido a los plásmidos que posee (6), algunos de los cuales le confieren también resistencia a metales como el mercurio, cadmio, telurito, arseniato, cromato (5, 31, 40), esta situación le permite proliferar en ambientes hospitalarios, donde los antibióticos son ampliamente utilizados. Esta bacteria es responsable de múltiples padecimientos en humanos, tales como septicemia, queratitis, infecciones pulmonares, sepsis, hemorragias, conjuntivitis y es capaz de causar hasta la muerte (34). Todo provocado por los múltiples factores de virulencia que posee.

En la tabla que se enlista a continuación se anotan los efectos descritos por las proteínas y enzimas de *P.aeruginosa*.

## FACTOR DE VIRULENCIA

## EFEECTO

TOXINA A	Su toxicidad es atribuible a su habilidad para inhibir la síntesis de proteínas en el ribosoma, por ADP-ribosilación del factor de elongación 2 (EF 2); esta habilidad ha sido demostrada in vitro. (19, 27,31, 32)
EXOENZIMA S	También inhibe síntesis de proteínas. Los primeros resultados con exoenzima S cruda, sugieren que el factor de elongación 1 puede ser modificado. (20).
PROTEASA ALCALINA	Purificada es capaz de causar necrosis y lesiones ulcerantes en pulmones cuando se inyecta subcutáneamente o por vía intravenosa y úlceras corneales cuando se inyecta por vía intracraneal o intranasal, y hemorragia y necrosis en el tracto gastrointestinal cuando se inyecta intaperitonealmente.(11, 15, 21, 26).
ELASTASA	Degrada 7 de los 9 componentes del complemento e inhibe el movimiento de leucocitos polimorfonucleares al sitio de inflamación disminuyendo la capacidad fagocítica (37). Otro efecto de esta proteína es degradar inmunoglobulinas generando fragmentos del tipo Fc y Fab (43).
LEUCOCIDINA	Es una proteína citotóxica capaz de causar lisis en linfocitos y granulocitos de varias especies animales, a concentraciones tan bajas como 20 ng. por 1 000 000 células.
FOSFOLIPASA C o HEMOLISINA TERMOLÁBIL	Hidroliza fosfatidil colina a fosforil colina y diacil glicerol (4 y 14)
RAMNOLÍPIDO o HEMOLISINA TERMOESTABLE	Pequeña molécula con actividad detergente capaz de solubilizar fosfatos. (16, 36).
GLUCOCÁLIX o ALGINATO	Exopolisacárido producido por algunas cepas clínicas aisladas de pacientes con fibrosis quística. Evita fagocitosis causada por leucocitos (48).
FLAGELO	Ayuda a la movilidad del organismo facilitando la invasión de hospedero (28)
LIPOPOLISACÁRIDO	Resistencia al efecto bactericida del suero humano normal, (9).



## **2.- BACTERIÓFAGOS**

Los bacteriófagos (“comedores de bacterias”), son parásitos intracelulares obligados, sus hospederos son las bacterias, de quienes utilizan la maquinaria biosintética para realizar sus ciclos de desarrollo

### **2.1.- ESTRUCTURA**

Se han aislado y estudiado al microscopio electrónico cerca de 2000 fagos, todos los cuales pueden clasificarse en 4 grupos según su forma:

Grupo 1.- fagos con cola

Grupo 2.- fagos cúbicos o poliédricos

Grupo 3.- fagos filamentosos

Grupo 4.- fagos pleomórficos.

De un grupo a otro varían las formas, observaciones al microscopio electrónico indican que todos tienen una estructura básica que puede ser poliédrica o cúbica.

La forma poliédrica predominante es el icosaedro (20 caras triangulares y 12 vértices) (12).

En los fagos sin cola, se encuentran pequeñas espículas en los vértices del icosaedro.

Los fagos filamentosos generalmente parecen un cilindro dentro del cual, en una cavidad helicoidal se encuentra el ácido nucleico, exteriormente carecen de cualquier apéndice.

La cabeza y la cola de los fagos son estructuras proteínicas codificadas por su genoma.

### **2.2.- COMPOSICIÓN QUÍMICA.**

Una característica representativa de los fagos es que poseen un solo tipo de ácido nucleico y nunca ambos, y de acuerdo al tipo de éste se denominan fagos de DNA o fagos de RNA.

Estos ácidos nucleicos se encuentran protegidos por proteínas y se localizan en la cabeza del fago, y poseen la información necesaria para su multiplicación.

El ácido nucleico, puede ser monoténico (de una sola cadena) o biténico (de dos cadenas), independientemente que sea DNA o RNA.

## 2.3.- CICLOS DE DESARROLLO.

De acuerdo al ciclo de desarrollo, los bacteriófagos se clasifican en líticos y temperados o lisogénicos. Entre unos y otros existen ciertas diferencias, los líticos presentan un ciclo de desarrollo que puede dividirse en cinco pasos:

a) Adsorción.- el fago reconoce receptores específicos por los que se fija a la bacteria, estos receptores se encuentran en la capa más externa de la pared. En los bacteriófagos, el órgano de adsorción se localiza en la cola y los fagos carentes de cola se adsorben por medio de las espículas.

Durante esta fase, la bacteria parece no tomar parte activa ya que los fagos pueden adsorberse en presencia de KCN, que inhibe los procesos metabólicos celulares, o bien en ausencia de metabolitos esenciales para el crecimiento bacteriano, es mas, son capaces de adsorberse a fragmentos de la pared celular (12).

b) Inyección.- El fago adsorbido a la bacteria, introduce en ella su material genético.

c) Eclipse.- Poco después de la inyección, la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas del hospedero cesan (23,39) 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 (12).

La biosíntesis del ácido nucleico viral requiere una fuente de energía así como precursores de bajo peso molecular, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos para RNA o DNA respectivamente. Varios experimentos han establecido que los fagos dependen de la bacteria hospedera en cuanto al suministro de subunidades requeridas para la síntesis de polinucleótidos (12).

d) Maduración.- 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 (12).

e) Lisis.- Con la acción de enzimas líticas presentes en los genes de los fagos, capaces de desintegrar la pared celular de las bacterias y provocar de esta manera la lisis, se liberan aproximadamente 100 nuevas partículas infecciosas (12, 39).

El ciclo de desarrollo de un fago lisogénico o temperado es similar al lítico diferenciándose en que una vez inyectado su ácido nucleico puede permanecer circularizado o integrarse al cromosoma de la bacteria (39) reproduciéndose en sincronía con el cromosoma bacteriano, solo una vez por cada generación de la bacteria. En la lisogenia, el fago y bacteria coexisten en armonía debido a que después de la inyección del DNA 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 DNA reprimido de algunos fagos se integra al genoma bacteriano y se replica pasivamente como parte de este, siendo heredado a las bacterias hijas.

El DNA viral reprimido se conoce como profago, la bacteria portadora como lisógena, y el proceso que conduce a la formación de esta como lisogenización.

### 3.- LISOGENIA

Una bacteria lisógena es aquella que en su interior porta un profago, el cual utiliza el sistema de replicación bacteriano o parte de la maquinaria metabólica para replicarse conjuntamente con el genoma de la bacteria replicativa. Esta situación tiene como consecuencia que la bacteria pueda liberar fagos cuando es sometida a situaciones de estrés (inducción) y que fagos del mismo tipo, sean incapaces de infectarla (inmunidad). En la naturaleza se ha encontrado que la lisogenia es una situación sumamente estable, de tal manera que existen cepas que han sido cultivadas en diferentes laboratorios y condiciones variables y éstas han permanecido estables, como ha sucedido con la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* pw8(p)tox+ que desde 1896 se ha mantenido en cultivo sin perder el profago (45). La lisogenia involucra la integración de una secuencia particular de genes (los genes del profago) en el genoma bacteriano, que actúan como una unidad durante la replicación, integración y escisión del genoma viral. La estabilidad de la lisogenia depende de la represión de los genes de funciones morfogenéticas y líticas del virus. Por otro lado, la gran cantidad de cepas clínicas de *P. aeruginosa* (el 100% de las estudiadas) son lisógenas y algunas polilisógenas (18). Como ya se mencionó antes, una bacteria lisógena no puede ser infectada por un fago homólogo al que porta dicha bacteria, a esta propiedad se le conoce como inmunidad y esta basada en la producción de proteínas represoras del genoma fágico, codificadas también por éste, de tal manera que cuando una bacteria contiene un profago, típicamente tiene en su citoplasma el represor, el cual es capaz de inhibir tanto la síntesis de proteínas del profago que porta, como de cualquier otro profago superinfectante de la misma.

#### 3.1.- CONVERSIÓN LISOGENICA.

Algunas bacterias lisógenas, además de presentar inmunidad a los fagos homólogos al que portan y de ser susceptibles a la inducción, adquieren también propiedades fenotípicas nuevas, conferidas por la presencia del profago tal es el caso de *C. diphtheriae* que al ser portadora del profago beta tox+, es capaz de sintetizar una toxina de efectos letales en el hombre y algunos mamíferos, excepto en rata y ratón. Esta toxina esta codificada por la secuencia de genes tox+, los cuales se activan por la presencia del profago. Otro ejemplo que ilustra la conversión lisogénica, es el caso de *P.aeruginosa* que al ser portadora del fago D3 presenta cambios en su antígeno somático, lo que le confiere resistencia a la fagocitosis por macrófagos peritoneales *in-vitro*. Se ha encontrado también que la presencia del fago FIZ 15 (fago de Iztacala no. 15) le confiere a la cepa PAO1 (libre de fagos) un incremento en la movilidad y la adhesión a células bucoepiteliales humanas al lisogenizar la cepa, también se tiene conocimiento de que aumenta la resistencia a fagocitosis por macrófagos de ratón, los valores de fagocitosis de la cepa PAO1/FIZ-15 (lisógena para FIZ 15) se ven disminuidos hasta en un 50 % con respecto al valor de PAO1.(1).

El DNA viral reprimido se conoce como profago, la bacteria portadora como lisógena, y el proceso que conduce a la formación de esta como lisogenización.

### 3.- LISOGENIA

Una bacteria lisógena es aquella que en su interior porta un profago, el cual utiliza el sistema de replicación bacteriano o parte de la maquinaria metabólica para replicarse conjuntamente con el genoma de la bacteria replicativa. Esta situación tiene como consecuencia que la bacteria pueda liberar fagos cuando es sometida a situaciones de estrés (inducción) y que fagos del mismo tipo, sean incapaces de infectarla (inmunidad). En la naturaleza se ha encontrado que la lisogenia es una situación sumamente estable, de tal manera que existen cepas que han sido cultivadas en diferentes laboratorios y condiciones variables y éstas han permanecido estables, como ha sucedido con la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* pw8(p)tox+ que desde 1896 se ha mantenido en cultivo sin perder el profago (45). La lisogenia involucra la integración de una secuencia particular de genes (los genes del profago) en el genoma bacteriano, que actúan como una unidad durante la replicación, integración y escisión del genoma viral. La estabilidad de la lisogenia depende de la represión de los genes de funciones morfogenéticas y líticas del virus. Por otro lado, la gran cantidad de cepas clínicas de *P. aeruginosa* (el 100% de las estudiadas) son lisógenas y algunas polilisógenas (18). Como ya se mencionó antes, una bacteria lisógena no puede ser infectada por un fago homólogo al que porta dicha bacteria, a esta propiedad se le conoce como inmunidad y esta basada en la producción de proteínas represoras del genoma fágico, codificadas también por éste, de tal manera que cuando una bacteria contiene un profago, típicamente tiene en su citoplasma el represor, el cual es capaz de inhibir tanto la síntesis de proteínas del profago que porta, como de cualquier otro profago superinfectante de la misma.

#### 3.1.- CONVERSIÓN LISOGÉNICA.

Algunas bacterias lisógenas, además de presentar inmunidad a los fagos homólogos al que portan y de ser susceptibles a la inducción, adquieren también propiedades fenotípicas nuevas, conferidas por la presencia del profago tal es el caso de *C. diphtheriae* que al ser portadora del profago beta tox+, es capaz de sintetizar una toxina de efectos letales en el hombre y algunos mamíferos, excepto en rata y ratón. Esta toxina esta codificada por la secuencia de genes tox+, los cuales se activan por la presencia del profago. Otro ejemplo que ilustra la conversión lisogénica, es el caso de *P.aeruginosa* que al ser portadora del fago D3 presenta cambios en su antígeno somático, lo que le confiere resistencia a la fagocitosis por macrófagos peritoneales *in-vitro*. Se ha encontrado también que la presencia del fago FIZ 15 (fago de Iztacala no. 15) le confiere a la cepa PAO1 (libre de fagos) un incremento en la movilidad y la adhesión a células bucoepiteliales humanas al lisogenizar la cepa, también se tiene conocimiento de que aumenta la resistencia a fagocitosis por macrófagos de ratón, los valores de fagocitosis de la cepa PAO1/FIZ-15 (lisógena para FIZ 15) se ven disminuidos hasta en un 50 % con respecto al valor de PAO1.(1).

### 3.2.-INDUCCIÓN.

Cuando las bacterias lisógenas son sometidas a dosis bajas de luz ultravioleta, liberan fagos; a esta situación se le conoce con el nombre de inducción. Existen otros agentes capaces de inducir bacterias lisógenas como lo son la mitomicina c, la fluoropirimidina etc.

En todos los casos el proceso es el mismo; inactivación del represor y expresión de los genes estructurales y de lisis.

De acuerdo al tipo de inducción, los fagos pueden clasificarse como sigue:

a) Los que son fácilmente inducibles por exposición a la luz ultravioleta, por ejemplo: colifagos lambda y corynebacteriofago beta tox+

b) Los que muestran una ligera liberación del fago, por ejemplo el colifago p1, el cual tiene los genes controladores separados del cromosoma del hospedero y es ligeramente inducible por luz ultravioleta, adicionalmente las células lisogenizadas por este fago adquieren la capacidad de restringir y modificar el DNA de lambda y de otros colifagos.

c) Los que no son inducibles por completo, por ejemplo: colifago p2, cuya respuesta es sumamente diferente a la luz ultravioleta este colifago puede ocupar cualquier sitio del cromosoma de la bacteria y no es inducible con luz ultravioleta, también provoca en la bacteria sensibilidad a pequeñas cantidades de 5 fluorodioxiuridina.

No obstante el conocimiento de la inducción, hasta hoy no se han descrito los mecanismos que se siguen, de tal manera que cada grupo de fagos temperados tienen características distintivas de acuerdo con la forma de infección, genes relacionados con la función lisogénica, número y/o sitios de integración y los mecanismos operantes para asegurar su estabilidad en las células.

## **4.-MÉTODOS DE ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE FAGOS.**

### **4.1.-TITULACIÓN :**

Los bacteriófagos se pueden observar indirectamente por la placa (hueco) que una unidad formadora de placa deja sobre un tapiz (césped) de bacterias sensibles de tal manera que si se ponen en contacto números iguales de bacteriófagos y de bacterias sensibles, lo que observaremos es la lisis de todas o de la mayoría de las bacterias (las únicas que no serán lisadas serán las mutantes bacterianas que fueran resistentes a la infección), por esta razón es importante diluir las soluciones de fagos para poder observar y contar placas. Se asume que cada placa es originada por una partícula fágica o unidad formadora de placa y de esta manera se puede calcular el numero de unidades formadoras de placas que se tienen en la solución original.

### **4.2.-ECLOSIÓN SENCILLA.**

Cuando deseamos conocer el número de partículas fágicas con capacidad infectiva, que una bacteria sensible es capaz de liberar después de ser lisada durante una infección productiva, realizamos un experimento de eclosión sencilla. Esta propiedad es constante en las cepas de bacteriófagos y se ha caracterizado que *Escherichia coli* al ser lisada por el fago lambda, libera aproximadamente 100 fagos por bacteria.

### **4.3.-TASA DE LIBERACIÓN ESPONTÁNEA DE FAGOS TEMPERADOS:**

En el cultivo de lisógenas (normalmente) se están liberando bacteriófagos, esto se puede corroborar centrifugando el cultivo a fin de empaquetar las bacterias y colocando una gota de sobrenadante de este centrifugado sobre un tapiz de bacterias sensibles, por lo regular en el sitio de la gota aparece un gran hueco indicador de las infecciones líticas de los fagos sobre las bacterias.

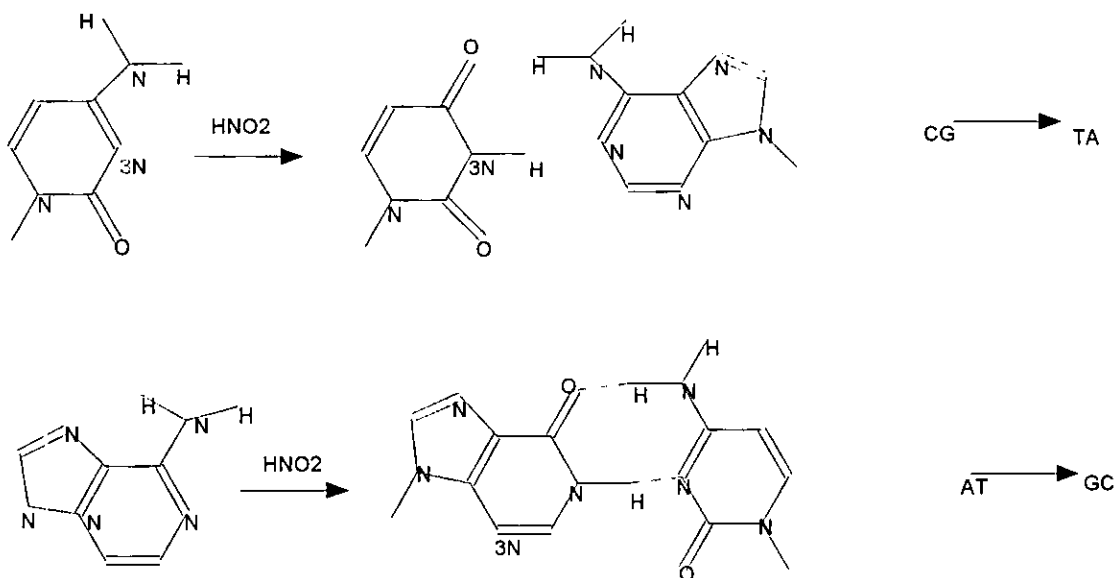
El nivel de liberación espontánea de los fagos puede ser calculado diluyendo el sobrenadante de un cultivo de lisógenas y evaluando la cantidad de bacterias contra la cantidad de fagos, obteniéndose de esta manera la tasa de liberación espontánea de la cepa que se considera otra característica particular.

#### 4.4.-TASA DE MUTACIÓN:

Las diferentes características fenotípicas de un organismo son el resultado de la expresión del genotipo y de la influencia ambiental sobre uno u otro carácter, por ejemplo el tamaño de placa de un fago se ve afectado por factores ambientales como la concentración de agar, la temperatura y el tiempo en que se desarrolló la infección, cuando el agar está muy suave o la temperatura un poco más alta, se favorece la difusión de los fagos y aumenta el tamaño de la placa, al igual que cuando se mantiene la incubación por más de un día.

Un carácter podrá variar en relación con la importancia del mismo con respecto a la aptitud que confiera al organismo. Citemos por ejemplo el caso de bacterias sensibles a un bacteriófago; cuando la población es lo suficientemente grande, (2 mil millones de bacterias por mililitro) aparecen algunas mutantes resistentes a la infección fágica (variantes atípicas bacterianas capaces de crecer en presencia de fagos infectantes). La aparición de mutantes resistentes a la infección obedece a una distribución de Poisson y ese carácter disminuye la velocidad de crecimiento de las bacterias que lo poseen. Cuando se tienen propósitos definidos para encontrar y seleccionar variantes poblacionales que presenten fenotipos de interés, es conveniente calcular los índices o tasas de mutación que presentan para un carácter determinado.

Con el fin de obtener con mayor frecuencia una mutante deseada, se desarrollan métodos de mutagénesis utilizando diferentes agentes causales, entre los mutágenos químicos, el más utilizado es el  $\text{HNO}_2$



El cual por desaminación oxidativa de la citosina (ver figura) puede convertirnos la citosina en uracilo, cuando eso sucede, en el siguiente ciclo de replicación la cadena de ADN que tiene sustituida la citosina por uracilo se origina un par UA en lugar del par CG original. Es importante considerar que los agentes mutagénicos también pueden afectar la viabilidad de los organismos expuestos a ellos y esto puede depender de los mecanismos de reparación implícitos en el genoma de los organismos . De tal manera que si un organismo posee más de una vía de reparación es posible que el efecto letal de un mutágeno sea menor que en un organismo con una sola vía de reparación .

## 5.- ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio se han aislado 210 bacteriófagos temperados a partir de cepas clínicas y se construyeron lisógenas estables y de ellas se distinguieron 19 tipos diferentes, cuando se probó la inmunidad de lisógenas a la superinfección de todas (25).

Se ha escogido para estudiar a uno de los 19 fagos, pues su lisógena mostró un incremento de cuatro veces en el título de aglutinación con antisuero obtenido en conejo, dirigido contra PAO1 muerta por calor lo que sugirió que el profago elegido, FIZ15, le causó un cambio superficial a la lisógena a nivel de algún (os) antígeno (s). Para comprobar si el cambio superficial causado por FIZ15 estaba relacionado con algunas propiedades de virulencia, se compararon las cepas PAO1 y la PAO1(FIZ15) en relación a la adhesión a células bucoepiteliales humanas, sensibilidad al efecto bactericida del suero humano normal y fagocitosis por macrófagos peritoneales de ratón in-vitro. La lisógena mostró una adhesión 1.5 veces mayor que PAO1 a células bucoepiteliales humanas (42); una sobrevivencia de 6 a 20 veces mayor al efecto bactericida del suero humano a concentraciones de 75 y 80%, respectivamente (8) y una sobrevivencia 2 veces mayor a la fagocitosis por macrófagos de ratón (41). Durante estas pruebas se observó que FIZ15 es incapaz de formar placas en la cepa PAO1 lisógena para el fago D3 (fago de referencia descrito caracterizado y donado por B.W.Holloway) y que este es incapaz de crecer en PAO1(FIZ15), lo que sugiere que ambos fagos utilizan el mismo receptor. Para comprobar esta hipótesis se midió la adsorción de ambos fagos en cepas PAO1, PAO1(D3) y PAO1(FIZ15), como se esperaba ambos fagos, se adsorbieron en un 90% en 6 min. a la cepa PAO1 y ninguno de los dos fue capaz de adsorberse a las otras cepas (1-4% en 6 min.), con lo que quedó demostrado que ambos fagos utilizan el mismo receptor y que causan conversión lisogénica a nivel del mismo (8). Reforzando esta conclusión, se obtuvo una mutante espontánea resistente al fago FIZ15 (cepa PAO1/15), ésta no permitió que se adsorbieran los fagos D3 y FIZ15, mostró además una resistencia dos veces mayor a la fagocitosis, aumentó 10 y 30 veces la resistencia al efecto bactericida del suero humano en concentraciones de 70 y 80% y una adhesión cuatro veces mayor a células bucoepiteliales que posee la cepa PAO1 (1). Los resultados anteriores sugieren que la resistencia a la fagocitosis y al efecto bactericida del suero y el incremento en la adhesión a células bucoepiteliales que posee la lisógena PAO1(FIZ15) se deben al cambio superficial a nivel del receptor que es el antígeno O, ya que el fago D3 es antígeno O-específico (40). Se vé claramente que estos son factores de virulencia importantes ya que facilitan la colonización y posterior invasión sistémica por evasión de líneas de defensa del hospedero.



El cual por desaminación oxidativa de la citosina (ver figura) puede convertirnos la citosina en uracilo, cuando eso sucede, en el siguiente ciclo de replicación la cadena de ADN que tiene sustituida la citosina por uracilo se origina un par UA en lugar del par CG original. Es importante considerar que los agentes mutagénicos también pueden afectar la viabilidad de los organismos expuestos a ellos y esto puede depender de los mecanismos de reparación implícitos en el genoma de los organismos. De tal manera que si un organismo posee más de una vía de reparación es posible que el efecto letal de un mutágeno sea menor que en un organismo con una sola vía de reparación.

## 5.- ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio se han aislado 210 bacteriófagos temperados a partir de cepas clínicas y se construyeron lisógenas estables y de ellas se distinguieron 19 tipos diferentes, cuando se probó la inmunidad de lisógenas a la superinfección de todas (25).

Se ha escogido para estudiar a uno de los 19 fagos, pues su lisógena mostró un incremento de cuatro veces en el título de aglutinación con antisuero obtenido en conejo, dirigido contra PAO1 muerta por calor lo que sugirió que el profago elegido, FIZ15, le causó un cambio superficial a la lisógena a nivel de algún (os) antígeno (s). Para comprobar si el cambio superficial causado por FIZ15 estaba relacionado con algunas propiedades de virulencia, se compararon las cepas PAO1 y la PAO1(FIZ15) en relación a la adhesión a células bucoepiteliales humanas, sensibilidad al efecto bactericida del suero humano normal y fagocitosis por macrófagos peritoneales de ratón in-vitro. La lisógena mostró una adhesión 1.5 veces mayor que PAO1 a células bucoepiteliales humanas (42); una sobrevivencia de 6 a 20 veces mayor al efecto bactericida del suero humano a concentraciones de 75 y 80%, respectivamente (8) y una sobrevivencia 2 veces mayor a la fagocitosis por macrófagos de ratón (41). Durante estas pruebas se observó que FIZ15 es incapaz de formar placas en la cepa PAO1 lisógena para el fago D3 (fago de referencia descrito caracterizado y donado por B.W.Holloway) y que este es incapaz de crecer en PAO1(FIZ15), lo que sugiere que ambos fagos utilizan el mismo receptor. Para comprobar esta hipótesis se midió la adsorción de ambos fagos en cepas PAO1, PAO1(D3) y PAO1(FIZ15), como se esperaba ambos fagos, se adsorbieron en un 90% en 6 min. a la cepa PAO1 y ninguno de los dos fue capaz de adsorberse a las otras cepas (1-4% en 6 min.), con lo que quedó demostrado que ambos fagos utilizan el mismo receptor y que causan conversión lisogénica a nivel del mismo (8). Reforzando esta conclusión, se obtuvo una mutante espontánea resistente al fago FIZ15 (cepa PAO1/15), ésta no permitió que se adsorbieran los fagos D3 y FIZ15, mostró además una resistencia dos veces mayor a la fagocitosis, aumentó 10 y 30 veces la resistencia al efecto bactericida del suero humano en concentraciones de 70 y 80% y una adhesión cuatro veces mayor a células bucoepiteliales que posee la cepa PAO1 (1). Los resultados anteriores sugieren que la resistencia a la fagocitosis y al efecto bactericida del suero y el incremento en la adhesión a células bucoepiteliales que posee la lisógena PAO1(FIZ15) se deben al cambio superficial a nivel del receptor que es el antígeno O, ya que el fago D3 es antígeno O-específico (40). Se ve claramente que estos son factores de virulencia importantes ya que facilitan la colonización y posterior invasión sistémica por evasión de líneas de defensa del hospedero.

Otro de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio es que las bacterias lisógenas son resistentes a estreptomycin con un MIC de 40 microgramos por mililitro de antibiótico a diferencia de PAO1 cuyo MIC es aproximado a 10 microgramos/ml.

Por último debemos mencionar que gran parte del trabajo de caracterización de los bacteriófagos, se ha realizado estudiando las modificaciones de las propiedades de su virulencia, pero consideramos importante que se realice trabajo con otras características propias de los bacteriófagos en su relación con las bacterias, entre estas se encuentran: a).- La cantidad de bacteriófagos liberados por una bacteria lisada por infección (curva de eclosión sencilla); b).- La liberación espontánea de bacteriófagos en un cultivo de lisógenas que crecen a fase estacionaria ; c).- La cantidad de bacteriófagos que se inactivan al estar en contacto con algún mutágeno (tasa de mortalidad). Todas las propiedades anteriores no se han descrito en las variedades mutantes de bacterias.

## **6.- OBJETIVOS:**

### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar mutantes del bacteriófago FIZ15 deficientes en la promoción de la conversión lisogénica:

#### **Objetivos Particulares.**

6.1.- Evaluar de la tasa de mutación causada por un agente mutagénico, ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>), por medio de la obtención de mutantes fenotípicas, cepas que forman placas claras.

6.2.- Evaluación de la tasa de mutación con Etil Metano Sulfonato (EMS) para un carácter del fago a partir de la obtención de lisógenas sensibles a estreptomycin.

6.3- Caracterizar las cepas resistentes a estreptomycin lisógenas y relisogenizadas por fagos mutantes (criterio de selección para mutantes deficientes en la conversión lisogénica).

Para su caracterización se calcularon los siguientes parámetros comparativos:

6.4.- Tasa de mortalidad (inactivación fágica) tanto en FIZ15 como en sus mutantes en presencia de HNO<sub>2</sub>.

6.5.- Tasas de eclosión del fago FIZ15 y sus mutantes.

Otro de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio es que las bacterias lisógenas son resistentes a estreptomina con un MIC de 40 microgramos por mililitro de antibiótico a diferencia de PAO1 cuyo MIC es aproximado a 10 microgramos/ml.

Por último debemos mencionar que gran parte del trabajo de caracterización de los bacteriófagos, se ha realizado estudiando las modificaciones de las propiedades de su virulencia, pero consideramos importante que se realice trabajo con otras características propias de los bacteriófagos en su relación con las bacterias, entre estas se encuentran: a).- La cantidad de bacteriófagos liberados por una bacteria lisada por infección (curva de eclosión sencilla); b).- La liberación espontánea de bacteriófagos en un cultivo de lisógenas que crecen a fase estacionaria ; c).- La cantidad de bacteriófagos que se inactivan al estar en contacto con algún mutágeno (tasa de mortalidad). Todas las propiedades anteriores no se han descrito en las variedades mutantes de bacterias.

## **6.- OBJETIVOS:**

### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar mutantes del bacteriófago FIZ15 deficientes en la promoción de la conversión lisogénica:

#### **Objetivos Particulares.**

6.1.- Evaluar de la tasa de mutación causada por un agente mutagénico, ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>), por medio de la obtención de mutantes fenotípicas, cepas que forman placas claras.

6.2.- Evaluación de la tasa de mutación con Etil Metano Sulfonato (EMS) para un carácter del fago a partir de la obtención de lisógenas sensibles a estreptomina.

6.3- Caracterizar las cepas resistentes a estreptomina lisógenas y relisogenizadas por fagos mutantes (criterio de selección para mutantes deficientes en la conversión lisogénica).

Para su caracterización se calcularon los siguientes parámetros comparativos:

6.4.- Tasa de mortalidad (inactivación fágica) tanto en FIZ15 como en sus mutantes en presencia de HNO<sub>2</sub>.

6.5.- Tasas de eclosión del fago FIZ15 y sus mutantes.

6.6.- Tasas de liberación espontánea del fago FIZ15 y sus mutantes.

## **7.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **7.1.-MATERIAL BIÓLOGICO.**

#### **7.1.1. CEPAS DE BACTERIAS**

PAO1: Cepa silvestre de *Pseudomonas aeruginosa* libre de fagos de uso internacional donada por B. W. Holloway. Monash. University, Australia.

PIZ15\*: Cepa lisógena de *Pseudomonas aeruginosa* con el fago No. 15 de Iztacala. (FIZ15)

#### **7.1.2. CEPAS DE BACTERIÓFAGOS**

FIZ15\*: Fago temperado obtenido a partir de una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa*.

CON 1\*: Fago temperado obtenido a partir de una lisógena sensible a estreptomycinina.

CON 2\*: Fago temperado obtenido a partir de una lisógena sensible a estreptomycinina independiente a CON 1.

GEN 1\*: Fago temperado producido por relisogenización del fago CON 1 sobre PAO1.

GEN 2\*: Fago temperado producido por relisogenización del fago CON 2 sobre PAO1.

\*(Cepas construídas en el laboratorio de Genética de la ENEPI.)

6.6.- Tasas de liberación espontánea del fago FIZ15 y sus mutantes.

## **7.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **7.1.-MATERIAL BIÓLOGICO.**

#### **7.1.1. CEPAS DE BACTERIAS**

PAO1: Cepa silvestre de *Pseudomonas aeruginosa* libre de fagos de uso internacional donada por B. W. Holloway. Monash. University, Australia.

PIZ15\*: Cepa lisógena de *Pseudomonas aeruginosa* con el fago No. 15 de Iztacala. (FIZ15)

#### **7.1.2. CEPAS DE BACTERIÓFAGOS**

FIZ15\*: Fago temperado obtenido a partir de una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa*.

CON 1\*: Fago temperado obtenido a partir de una lisógena sensible a estreptomicina.

CON 2\*: Fago temperado obtenido a partir de una lisógena sensible a estreptomicina independiente a CON 1.

GEN 1\*: Fago temperado producido por relisogenización del fago CON 1 sobre PAO1.

GEN 2\*: Fago temperado producido por relisogenización del fago CON 2 sobre PAO1.

\*(Cepas construídas en el laboratorio de Genética de la ENEPI.)

## 7.2.- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

CN.: Caldo nutritivo: (Caldo nutritivo BIOXON 8 gr/ml. de agua destilada, esterilizado 15 min. en autoclave ).

AN.: Agar nutritivo: (CN + agar bacteriológico 1.5 %).

AS.: Agar suave: (CN + agar bacteriológico 0.6 %)

BA.: Buffer ácido: (Sulfato de magnesio 40 mM., acetato de sodio 0.25 M., ajustado a un pH 4.25 y esterilizado en autoclave durante 15 min.).

NaNO<sub>2</sub>.: Nitrito de sodio 35 mg/l preparado en agua estéril

SM.: (0.5 gr. de gelatina, 5.85 gr. de cloruro de sodio, 480.5 ml. de agua destilada, ajustado a pH 7.4, esterilizado en autoclave y adicionado con 4.5 ml de tris 0.1M. pH 7.4 y 2.5 ml. de Sulfato de Magnesio 1M., ambos esterilizados).

EMS.- Se preparó una solución al 5% volumen a volumen de EMS (Sigma Chemical Prdocuts) en buffer de Tris 1.0 M pH 7.4

## 7.3.- OBTENCIÓN DE LISADOS FÁGICOS.

En 10 ml. de CN. se suspendieron 0.5 ml. de cultivo (bacteriano PAO1) crecido toda la noche (T/N) de y 0.1 ml. de stock del fago FIZ15. Se incubaron con agitación hasta lisis (3 a 4 horas). Una vez lisadas las bacterias, se centrifugaron a 15,000 rpm. en microfuga Eppendorff durante 5 min. Se decantó el sobrenadante en tubos estériles y se conservó a 4 grados centígrados.

## 7.4.- TITULACIÓN DE LISADOS

Una vez centrifugados y decantados en tubos estériles, se realizaron 8 diluciones 1/10 en SM seriadas y se plaquearon sólo las 3 últimas diluciones: 0.1 ml. de cada una de éstas con 0.1 ml. de cultivo crecido T/N de PAO1 y 3 ml. de AS fundido y mantenido a 48 grados formando un tapiz sobre una caja de AN. Se incubó a 37 grados centígrados y se contó el número de unidades formadoras de placa (UFP). El título se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

UFP/ml. = No. de placas X 10/ factor de dilución.

## **7.5.- MUTAGÉNESIS CON ÁCIDO NITROSO.**

Se mezclaron 9 volúmenes de BA, un volumen de  $\text{NaNO}_2$  fresco y un volumen del stock del fago con título alto (1 E 8). Se incubó en reposo a temperatura ambiente (TA) y se retiraron alícuotas a los 10, 20, 30 y 40 min., Éstas se diluyeron 1/10 en SM + Tris a pH 7.7 y se agitaron rápidamente para detener la reacción. Se diluyó adecuadamente en SM y se titularon sobrevivientes (fagos con capacidad infectiva).

## **7.6.- MUTAGENÉSIS CON EMS**

Se crecieron bacterias hasta una densidad de  $2 \text{ E}8 / \text{ml}$ . en agar nutritivo, se centrifugaron y resuspendieron en la mitad del volumen original en un medio que contenía 0.2 M de Tris pH 7.5, se agregaron 0.03 ml. de solución de EMS se mezcló vigorosamente e incubó con aereación a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 a 2 hrs. Finalmente se diluyó la suspensión 10 veces y se analizaron los resultados de la mutagénesis de acuerdo al método de selección.

Se escogieron candidatas sensibles a estreptomicina haciendo réplicas en cajas con  $40 \mu\text{g}/\text{ml}$  del antibiótico y sin antibiótico. Las candidatas a presentar deficiencia en conversión crecieron solamente en la caja sin estreptomicina.

## **7.7.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE UN BACTERIÓFAGO**

Después de obtenida la mutagénesis, se seleccionaron las placas claras, se picaron con palillo estéril y se rayaron en una caja de AN, agregando 3 ml. de AS, se incubaron a 37 grados centígrados, se repitió dos o tres veces.

## **7.8.- MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE LA CURVA DE ECLOSIÓN SENCILLA DEL FAGO FIZ-15.**

Se creció la bacteria PAO1 en C.N. a 37 grados centígrados hasta alcanzar la  $D.O.(590)=0.4$ , el cultivo se infectó con FIZ-15 a una  $\text{mdi}=0.01$  permitiendo la adsorción en reposo a temperatura ambiente posteriormente el cultivo se centrifugó a 5000 R.P.M., 5 min. para eliminar el fago no adsorbido, la pastilla se resuspendió en 1 ml. de C.N., incubándose a 37 grados centígrados con agitación, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, se diluyeron y se plaquearon sobre bacterias sensibles.

## 8.- RESULTADOS.

### 8.1.- MUTAGÉNESIS CON ÁCIDO NITROSO.

Para probar que el ensayo de mutagénesis funcionó eficientemente elegimos un carácter fenotípico fácil de observar; placas claras, evaluamos el índice de mutación espontánea y el índice de mutación después de exponer los fagos al ácido nitroso. Como se puede observar en la tabla 1.

**TABLA 1.- INDICE DE MUTACIÓN.**

Tiempo	Número de mutantes claras	Título original	Índice de mutación(min)
0	0	4.2 e 10	n.d
10	2	4.2 e 10	4.7 e -11
20	12	4.2 e 10	2.8 e -10
30	13	4.2 e 10	3.0 e -10
40	16	4.2 e 10	3.8 e-10

□El índice de mutación espontánea para mutantes claras no pudo ser determinado ya que no se obtuvieron placas claras entre las cajas buscadas. Cuando mutagenizamos, el índice obtenido a los 10 min fue de 4.7 e -11, éste aumentó un orden de magnitud y fue muy similar a los 20, 30 y 40 minutos, alrededor de 3.3 e -11 (+,- 0.5). El índice de mutagénesis a los 20 minutos, fue 6 veces mayor que el observado a los diez min. Y no hay variación significativa del mismo a los 30 y 40 min. por lo anterior dedujimos que 20 minutos es el tiempo óptimo para mutagenizar con ácido nitroso .



## 8.2.-RESULTADOS DE MUTAGÉNESIS CON EMS

Se picaron 10 e 4 placas con lisógenas y se obtuvieron 20 candidatas que no crecieron en el medio con estreptomicina, sin embargo al resembrarlas, 18 de ellas revertían y volvieron a crecer en medio con antibiótico . Las dos candidatas restantes no lograron crecer en medio con estreptomicina y fueron denominadas CON<sub>1</sub> y CON<sub>2</sub>.

Por lo tanto el índice de mutación para la pérdida de resistencia a estreptomicina fué  $2e-4$ , que es mucho menor que el correspondiente a placa clara.

Se relisogenizó PAO1 con el fago derivado de CON<sub>1</sub> a esta cepa le nombramos GEN<sub>1</sub> y a la cepa relisogenizada con el fago derivado de CON<sub>2</sub> se le denominó GEN<sub>2</sub>.

### 8.3.-CÁLCULO DE LA TASA DE "MORTALIDAD" (INACTIVACIÓN FÁGICA).

#### Curva de mortalidad (inactivación fágica).

Toda vez que los agentes químicos no son sólo mutagénicos sino también son causantes de "muerte" (inactivación fágica), registramos la tasa de mortalidad para las 5 cepas de fagos; FIZ15, CON1, CON2, GEN1 Y GEN2, obteniendo los siguientes resultados:

**TABLA 2.- CURVA DE MORTALIDAD (INACTIVACIÓN FÁGICA)**

Tiempo	FIZ15	Con1	Con2	Gen1	Gen2
0	4.2 e10 10%	1.87 e 10 17%	7.06 e 10 21%	1.9 e 11 19%	2.14 e 11 21%
10	4.6 e 9 32%	3.3 e 9 21%	1.5 e 10 20%	3.6 e 10 20%	4.5 E 10 16%
20	1.5 e 9 20%	7.2 e 8 21%	2.4 e 9 21%	7.2 e 9 18%	7.3 e 9 21.6%
30	3.1 e 10 17%	1.4 e 7 17%	5.1 e 8 8%	1.3 e 9 18%	1.58 e 8 17%
40	5.3 e 6 17%	2.4 e 6 17.8%	9.1 e 7 18%	2.45 e 8 18%	2.7 e 7 17%
M=	-0.1604	-0.1647	-0.1668	-0.17	-0.1669
R=	99.14	99.94	99.94	93.51	99.90

□ Como se puede observar en la tabla anterior, existe una relación lineal entre el porcentaje de mortalidad y el tiempo, el cual corresponde aproximadamente al 16.6% ( $\pm 0.6\%$ ) cada diez minutos. Para validar estos resultados se realizaron regresiones lineales cuyo coeficiente de regresión fue para FIZ15 R= 99.14%, CON1 99.94%, CON2 99.94%, GEN1 93.51% y GEN2 99.94%, es decir muy cercano a uno por lo que podemos concluir que la mortalidad de todas las cepas fágicas con respecto al mutágeno fue la misma.

Esto se puede observar graficado en la figura 2 curva de mortalidad (inactivación fágica)

# Curva de Mortalidad

Numero de Placas (in Millions)

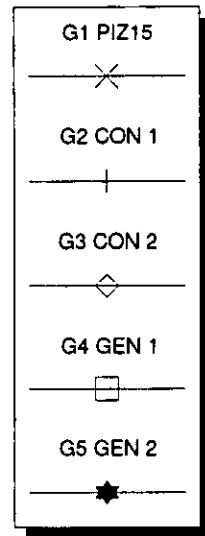
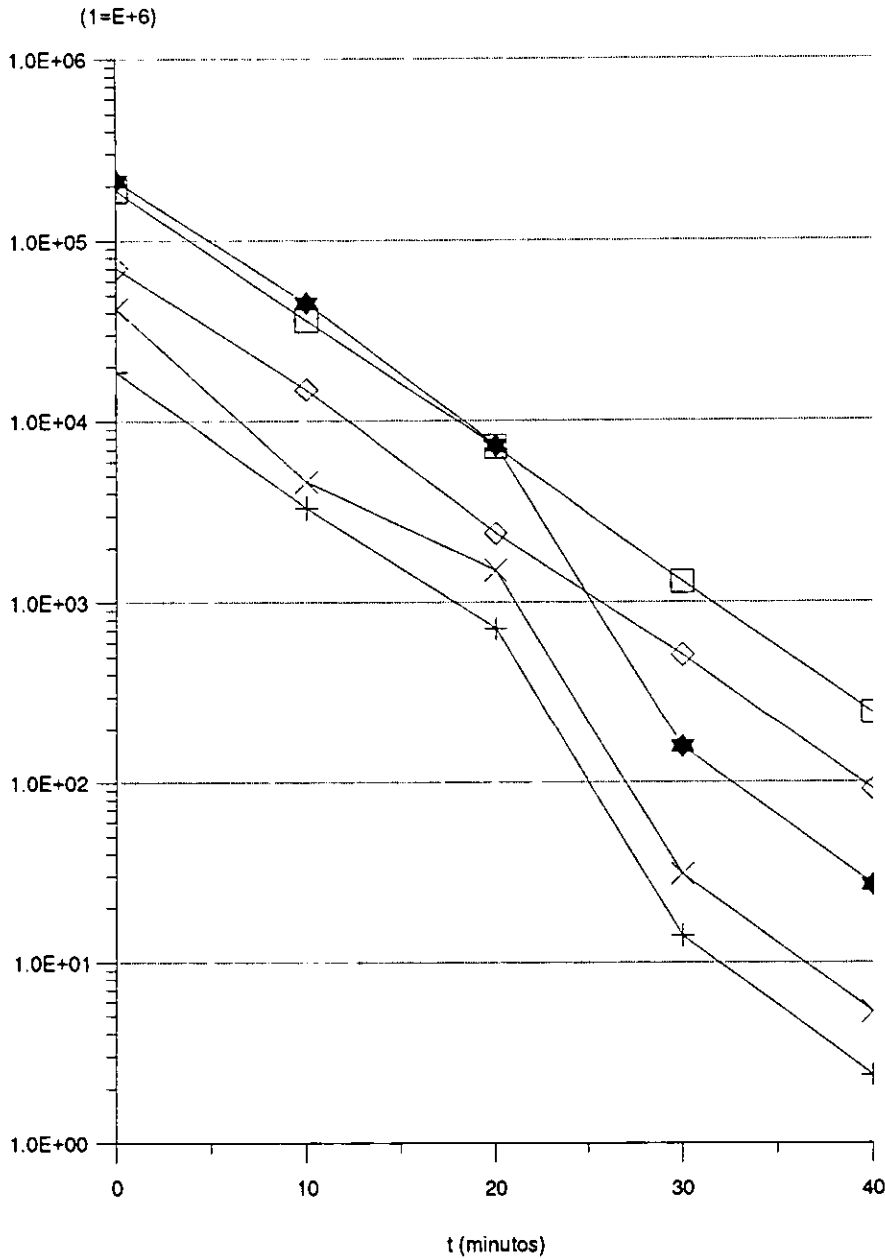


Figura 2. Cepas incubadas con acido nitroso a 37° C.,

plaqueadas sobre PAO1. G1=FIZ15; G2=CON1;

G3=CON2; G4=GEN1; G5=GEN2.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Para continuar con la caracterización de las cepas realizamos ensayos de eclosión sencilla como se describió en métodos , los resultados se anotan en la tabla 3 y se grafican en la figura 3.

**TABLA 3.- ECLOSIÓN SENCILLA**

Tiempo	PIZ15	CON1	CON2	GEN1	GEN2
0	1.3 e 5	5.8 e 5	1.21 e 4	5.0 e 5	1.14 e 5
15	1.1 e 5	5.6 e 5	1.30 e 4	3.2 e 5	1.49 e 5
20	2.5 e 5	1.0 e 6	2.10 e 4	4.6 e 5	2.50 e 5
30	1.4 e 6	5.9 e 6	1.00 e 5	1.5 e 6	1.50 e 6
35	3.6 e 6	1.0 e 7	2.20 e 5	4.0 e 6	3.30 e 6
45	1.2 e 7	3.1 e 7	5.80 e 5	1.2 e 7	1.00 e 7
60	1.4 e 7	3.7 e 7	1.20 e 6	1.5 e 7	1.30 e 7

□ Como se puede observar existe un crecimiento poblacional estable en los primeros 20 minutos (se puede decir que no se han liberado fagos) a partir del minuto 20 y hasta los 40 minutos, el crecimiento de la población observa un comportamiento exponencial, al llegar a este tiempo se inflexiona la curva y se observó un comportamiento estable hasta los 75 minutos realizando el cálculo directo, podemos decir que FIZ15 libera 106 fagos/bacteria, CON1 63 fagos/bacteria, CON2 100 fagos/bacteria, GEN1 50 fagos/bacteria y GEN2 118 fagos/bacteria. Es interesante destacar que la mutante CON1 y su derivada GEN1, tienen un comportamiento diferente a FIZ15 ya que liberaron  $55 \pm 10$  fagos bacteria a diferencia de los 100 liberados por la cepa FIZ15, en tanto que la mutante CON2 y su derivada presentan un crecimiento similar a esta.

# Eclosion Sencilla

UFP (in Thousands)

(1=E+3)

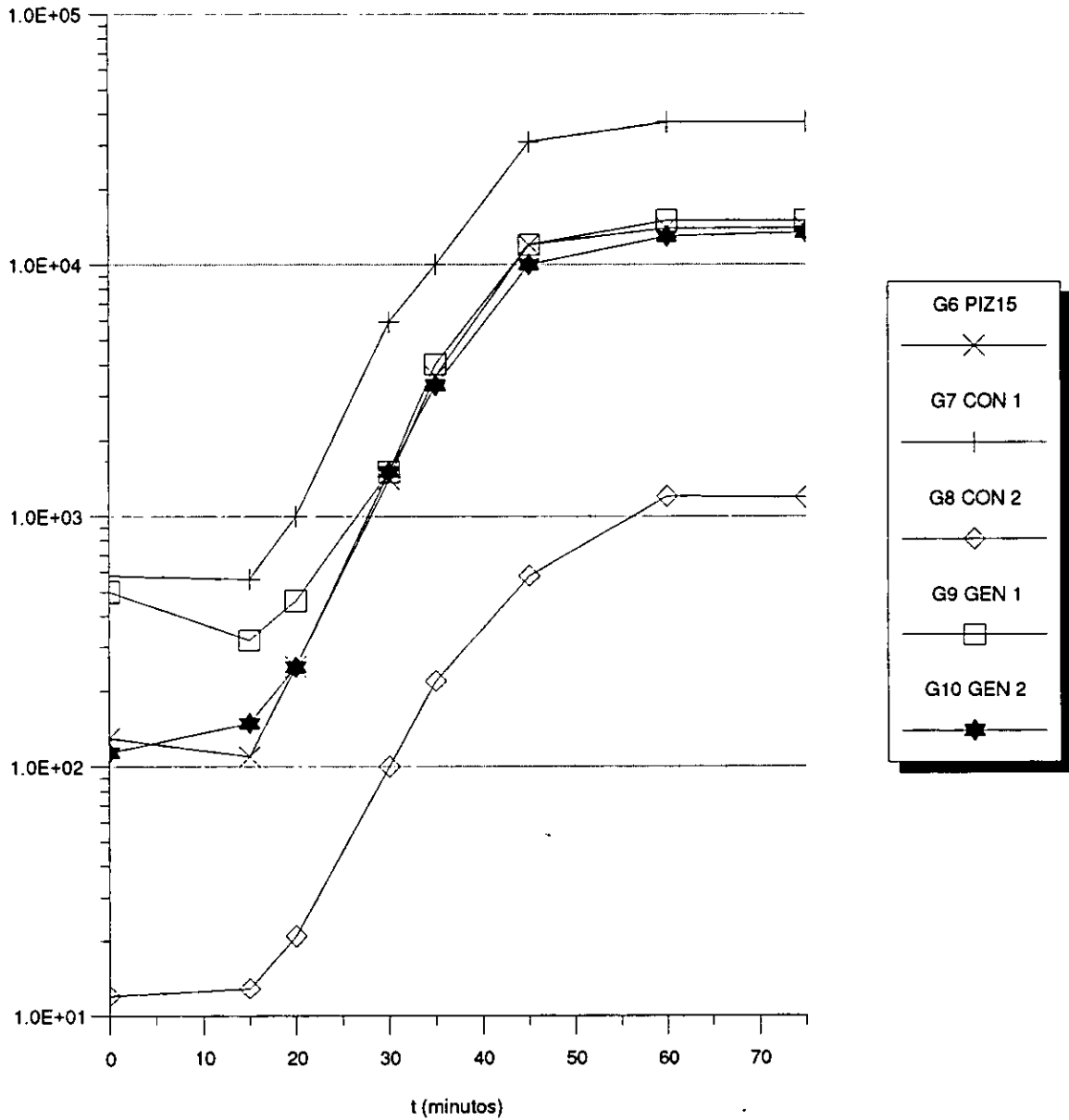


Figura 3. Cepas de PAO1 infectadas con cepas fágicas, se tomaron

alícuotas que fueron centrifugadas y tituladas, para saber cual fue la producción de bacteriófagos de cada cepa.

G6=PIZ15; G7=CON1; G8=CON2; G9=GEN1; G10=GEN2.

Con el fin de validar el modelo de crecimiento poblacional se introdujeron los datos en el programa de transformación logística, diseñado por Stats Graphics, este programa mostró que el modelo es adecuado como lo indican los coeficientes de regresión de la tabla 4A..

**TABLA 4.- TRANSFORMACIÓN LOGÍSTICA.**

Minutos	YFIZ15	YCON1	YCON2	YGEN1	YGEN2
0	4.673133	4.142587	4.59512	3.899275	4.773209
15	4.548618	4.178227	4.52262	3.833386	4.502862
20	4.01458	3.586293	4.036345	3.460969	3.977811
30	2.166094	1.665466	2.406945	2.20534	2.08774
35	0.4173	0.996949	1.504077	1.021551	1.138221
45	-1.74297	-1.6257	0.082692	-1.35028	-1.02165
60	-4.94164	-5.9135	-4.78749	-3.07577	-4.91533
75	-4.24133	-5.9135	-4.085998	-7.31986	-4.90527

**□TABLA 4 A .- COEFICIENTES DE REGRESIÓN**

cepa	Coefficiente
FIZ15	90.60
CON1	92.01
CON2	90.21
GEN1	96.35
GEN2	93.06

#### **8.4.-LIBERACIÓN ESPONTÁNEA DE FAGOS**

□

□Para concluir esta fase de caracterización evaluamos la tasa de liberación espontánea de cada una de nuestras cepas fágicas , cuyos resultados se presentan en la tabla 5, en ella podemos notar que la lisógena PIZ15 libera de 1 a 6 fagos de cada 100 lisógenas, la lisógena CON1 libera un fago de cada 116 bacterias y su derivada GEN1, libera un fago de cada 153 bacterias, por otra parte las lisógenas CON2 y su derivada GEN2 liberaron de 6 a 10 fagos cada 100 bacterias lo que nos sigue indicando que son similares a PIZ15.

**TABLA 5.- PORCENTAJE DE LIBERACIÓN ESPONTÁNEA DE FAGOS A PARTIR DE LAS LISÓGENAS PIZ15, CON 1, CON 2,**

**GEN 1 Y GEN 2.**

cepa	Título de bacterias	Fagos liberados	% de fagos liberados
PIZ15	2.0 e 9	2.0 e 7	1.00
	5.6 e 9	1.0 E 7	0.18
	3.7 e 9	2.0 e 8	6.20
CON1	3.0 e 9	3.5 e 7	0.90
	4.0 e 9	7.0 e 7	10.0
CON2	1.5 e 9	1.3 e 8	8.6
	1.0 e 9	1.0 e 8	10.0
GEN1	4.5 e 9	3.3 e 7	0.73
	3.5 e 9	2.0 e 7	0.57
GEN2	1.5 e 9	9.6 e 7	6.4
	9.8 e 8	9.8 e 7	10.0

**9.-DISCUSIÓN**

□En el presente trabajo hemos caracterizado al bacteriófago FIZ15 estudiando las propiedades constantes de la relación Bacteriófago-Bacteria, a diferencia de los trabajos precedentes, realizados en el laboratorio de Genética de UMF, en donde se centró el interés en la modificación de las propiedades de virulencia presentada por las lisógenas.

Con la determinación del aumento en el índice mutagénico causado por el HNO<sub>2</sub>, observamos que no aparecieron espontáneamente variantes claras y no fue hasta que se utilizó el mutágeno que éstas aparecieron a una frecuencia de 4.7 e -11; cuando aumentó el tiempo de acción del mutágeno, también aumentó la frecuencia de mutación en un orden de magnitud pero se estabilizó una vez alcanzada esta frecuencia, con ello se obtienen los tiempo óptimos de acción del mutágeno.

Para el caso de la mutagénesis con EMS, por ser realizada directamente sobre las bacterias lisógenas, la evaluación con base en nuestro método de selección correspondió a 2 e -4.

Respecto a la diferencias propias de los bacteriófagos mutantes con respecto al silvestre, la curva de mortalidad (inactivación fágica) causada por el HNO<sub>2</sub>, es prácticamente idéntica en el silvestre y las variantes, como lo muestra la figura 3, esta mortalidad concuerda con la reportada para el bacteriófago lamda cuando es sometido a mutagénesis con HNO<sub>2</sub>.

El crecimiento de todas las cepas fágicas es el típico crecimiento de fagos, característico de cualquier curva de eclosión sencilla, sin embargo la cantidad de fagos liberados por bacteria

**TABLA 5.- PORCENTAJE DE LIBERACIÓN ESPONTÁNEA DE FAGOS A PARTIR DE LAS LISÓGENAS PIZ15, CON 1, CON 2,**

**GEN 1 Y GEN 2.**

cepa	Título de bacterias	Fagos liberados	% de fagos liberados
PIZ15	2.0 e 9	2.0 e 7	1.00
	5.6 e 9	1.0 E 7	0.18
	3.7 e 9	2.0 e 8	6.20
CON1	3.0 e 9	3.5 e 7	0.90
	4.0 e 9	7.0 e 7	10.0
CON2	1.5 e 9	1.3 e 8	8.6
	1.0 e 9	1.0 e 8	10.0
GEN1	4.5 e 9	3.3 e 7	0.73
	3.5 e 9	2.0 e 7	0.57
GEN2	1.5 e 9	9.6 e 7	6.4
	9.8 e 8	9.8 e 7	10.0

**9.-DISCUSIÓN**

□En el presente trabajo hemos caracterizado al bacteriófago FIZ15 estudiando las propiedades constantes de la relación Bacteriófago-Bacteria, a diferencia de los trabajos precedentes, realizados en el laboratorio de Genética de UMF, en donde se centró el interés en la modificación de las propiedades de virulencia presentada por las lisógenas.

Con la determinación del aumento en el índice mutagénico causado por el HNO<sub>2</sub>, observamos que no aparecieron espontaneamente variantes claras y no fue hasta que se utilizó el mutágeno que éstas aparecieron a una frecuencia de 4.7 e -11; cuando aumentó el tiempo de acción del mutágeno, también aumentó la frecuencia de mutación en un orden de magnitud pero se estabilizó una vez alcanzada esta frecuencia, con ello se obtienen los tiempo óptimos de acción del mutágeno.

Para el caso de la mutagénesis con EMS, por ser realizada directamente sobre las bacterias lisógenas, la evaluación con base en nuestro método de selección correspondió a 2 e -4.

Respecto a la diferencias propias de los bacteriófagos mutantes con respecto al silvestre, la curva de mortalidad (inactivación fágica) causada por el HNO<sub>2</sub>, es prácticamente idéntica en el silvestre y las variantes, como lo muestra la figura 3, esta mortalidad concuerda con la reportada para el bacteriófago lamda cuando es sometido a mutagénesis con HNO<sub>2</sub>.

El crecimiento de todas las cepas fágicas es el típico crecimiento de fagos, característico de cualquier curva de eclosión sencilla, sin embargo la cantidad de fagos liberados por bacteria



fue diferencial para las distintas cepas: FIZ15 liberó 106 fagos / bacteria en tanto que CON1 sólo liberó 63 fagos/bacteria, un 59% tomando a FIZ15 como referente del 100%.

El valor de CON1 superó las desviaciones correspondientes al promedio de experimentos con FIZ15 que oscilaron entre el 5% y el 15% por lo que se puede concluir que el fago mutante obtenido de la lisógena PAOI(CON1) es diferente en esta propiedad, cosa que no sucede con el fago mutante derivado de la cepa PAO1(CON2) en el cual, la producción de 100 fagos/bacteria está dentro del rango de desviación que presenta FIZ15.

Decimos que la propiedad de eclosión fue una constante porque al relisogenizar y obtener las cepas PAO1(GEN1) y PAO1(GEN2) el comportamiento fágico conservó la característica anotada, es decir para GEN1 55 fagos /bacteria, en el rango de CON1 y diferente de la cepa FIZ15 y para GEN2 118 fagos/bacteria, en el rango de FIZ15 y CON2.

Los resultados mostrados en la tabla 5 sugieren lo siguiente, en tanto la variación para la liberación espontánea de fagos es amplia en la cepa PIZ15 oscilando de 0.18% al 6.2% las mutantes presentaron esta característica restringida de tal suerte que la cepa PAO1(CON1) y su derivada PAO1(GEN1) libera espontáneamente una cantidad de rango menor al 1%.

En tanto que las cepas PAO1(CON2) y su derivada PAOI(GEN2) liberaron espontáneamente una cantidad dentro del rango del 6% al 10% , se podría sugerir que se debe a que éstas últimas pueden liberar más fagos por bacteria espontáneamente en cada una de las cepas, en las bacterias PAOI(CON2) y PAO1(GEN2) obtuvimos un número mayor que en las bacterias PAO1(CON1) y PAO1(GEN1).

## **10.- CONCLUSION.**

El presente trabajo ha sido el punto de partida para una línea alternativa en la caracterización de bacteriófagos, en donde pretendimos conocer el sistema fago-bacteria, en relación con sus propiedades.

Caracterizar la aparición de mutantes para diferentes genes de los fagos, nos permitirá conocer la posible importancia de estos genes en el sistema fágico, hasta ahora pensamos que una propiedad relacionada con la virulencia de la lisógena, hacia un sistema orgánico mayor, resistencia a antibiótico; es tan importante como el sistema de mantenimiento del fago en el interior de la bacteria sin lisar a la bacteria (virulencia fágica).

Observamos que las mutaciones pueden también afectar la producción de fagos por bacteria, (curva de eclosión sencilla), o bien la diferencia en la producción espontánea en un sistema de lisógenas.

Continuar estudiando el comportamiento de las poblaciones de lisógenas nos permitiría probablemente modelar el posible origen y evolución de la relación, tema que nos parece que no hemos abordado.

fue diferencial para las distintas cepas: FIZ15 liberó 106 fagos / bacteria en tanto que CON1 sólo liberó 63 fagos/bacteria, un 59% tomando a FIZ15 como referente del 100%.

El valor de CON1 superó las desviaciones correspondientes al promedio de experimentos con FIZ15 que oscilaron entre el 5% y el 15% por lo que se puede concluir que el fago mutante obtenido de la lisógena PAOI(CON1) es diferente en esta propiedad, cosa que no sucede con el fago mutante derivado de la cepa PAO1(CON2) en el cual, la producción de 100 fagos/bacteria está dentro del rango de desviación que presenta FIZ15.

Decimos que la propiedad de eclosión fue una constante porque al relisogenizar y obtener las cepas PAO1(GEN1) y PAO1(GEN2) el comportamiento fágico conservó la característica anotada, es decir para GEN1 55 fagos /bacteria, en el rango de CON1 y diferente de la cepa FIZ15 y para GEN2 118 fagos/bacteria, en el rango de FIZ15 y CON2.

Los resultados mostrados en la tabla 5 sugieren lo siguiente, en tanto la variación para la liberación espontánea de fagos es amplia en la cepa PIZ15 oscilando de 0.18% al 6.2% las mutantes presentaron esta característica restringida de tal suerte que la cepa PAO1(CON1) y su derivada PAO1(GEN1) libera espontáneamente una cantidad de rango menor al 1%.

En tanto que las cepas PAO1(CON2) y su derivada PAOI(GEN2) liberaron espontáneamente una cantidad dentro del rango del 6% al 10% , se podría sugerir que se debe a que éstas últimas pueden liberar más fagos por bacteria espontáneamente en cada una de las cepas, en las bacterias PAOI(CON2) y PAO1(GEN2) obtuvimos un número mayor que en las bacterias PAO1(CON1) y PAO1(GEN1).

## **10.- CONCLUSION.**

El presente trabajo ha sido el punto de partida para una línea alternativa en la caracterización de bacteriófagos, en donde pretendimos conocer el sistema fago-bacteria, en relación con sus propiedades.

Caracterizar la aparición de mutantes para diferentes genes de los fagos, nos permitirá conocer la posible importancia de estos genes en el sistema fágico, hasta ahora pensamos que una propiedad relacionada con la virulencia de la lisógena, hacia un sistema orgánico mayor, resistencia a antibiótico; es tan importante como el sistema de mantenimiento del fago en el interior de la bacteria sin lisar a la bacteria (virulencia fágica).

Observamos que las mutaciones pueden también afectar la producción de fagos por bacteria, (curva de eclosión sencilla), o bien la diferencia en la producción espontánea en un sistema de lisógenas.

Continuar estudiando el comportamiento de las poblaciones de lisógenas nos permitiría probablemente modelar el posible origen y evolución de la relación, tema que nos parece que no hemos abordado.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arce, J., Arenas D., Argüello y 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. ENEPI UNAM. 44 pp.
- 2.- Berka, R. M. & M. L. Vasil, (1982). Phospholipase C (heat labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*; purification and preliminary characterization. J. Bacteriol. 152:239-245.
- 3.- Bodey, G.P., R. Bolivar, V. Fainstein & L. Jadeja, (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. 5:272-313.
- 4.-Cervantes, V. C., y L. E. Sosa. (1981). Análisis de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico. XII Congreso de Microbiología. Mérida, Yuc. pp. 10
- 5.- Cervantes, V. C., J. Chávez, N. A. Córdova, P. Mora & J. A. Velasco, (1986). Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Microbios, 48: 159-163.
- 6.- Chakrabarty, A. M. y L. E. Sosa, (1981). Análisis de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico. Resúmenes del XII Congreso Nacional de Microbiología. Mérida, Yuc. pp. 10.
- 7.-Cross, A. S., Sadoff, J. C. Iglewski, B. H. , & Sokol P. A., (1980). Evidence for the role of toxin A in the pathogenesis of interaction with *Pseudomonas aeruginosa* in humans. J. Infect. Dis. 142:583-596.
- 8.- Cruz, H. A., (1988). Resistencia al efecto bactericida del suero humano en *Pseudomonas aeruginosa*, mediada por conversión lisogénica. Tesis de licenciatura en Biología, E.N.E.P.I., U.N.A.M., 46 p.
- 9.- Cryz, S. J., T. L. Pitt y R. Germanier, (1984). Role of virulence of lipopolisaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 44: 508-513.
- 10.- Davis, B. D., et al. (1981). Tratado de Microbiología, 2a. Ed. Salvat Editores, Barcelona, España. 1599 p.
- 11.- Diener, B., Carrick, L. Jr. & Berk, R. S., (1973). In vivo studies with collagenase from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 7:212-217.
- 12.-Espejo, R. T.,(1980).Bacteriófagos. 2nd. Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos.

- 13.- Esselman, M. and Liu P. V. (1961). Lecithinase production by gram negative bacteria. **J. Bacteriol.** **81**: 939-941.
- 14.- Favero, M. S., et al. (1981). *Pseudomonas aeruginosa* growth in distilled water from hospital. **Science** **173**:863-838.
- 15.- Gray, L. D., & Kreger, A. S., (1979). Microscopic characterization of rabbit lung damage produced by *Pseudomonas aeruginosa* protease. **Infect. Immun.** **23**:150-159.
- 16.- Hirayama, T. , Kato, I., Matsuda, F., and Noda, M. (1983). Crystallization and some properties of leukocidin from *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol. Immunol.** **27**:575-583.
- 17.- Hoiby, N., (1977). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.** **262**.
- 18.- Holloway, B. H., (1974). Genetic organization of *Pseudomonas*. En Clarke, P. H. Richmond (eds), Genetics and Biochemistry of *Pseudomonas*, Wiley, London. pp 63-82.
- 19.- Iglewski, B. H., Elwell, L. P., Liu, P. V. & Kabat, D., (1973). ADP-ribosylation exotoxin A and by diphtheria toxin. In "Proceedings of the 4th International Symposium on the Metabolic Interconversion of Enzymes" (S. Shaltier, ed.) pp. 150-155 Springer-Verlag Berlin.
- 20.- Iglewski, B. H., Sadoff, J. C., Bjorn, M. D. & Maxwell, E. S., (1978). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: An adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **75**:3211-3215-
- 21.- Kawaharajo, K., J. Y. Homma, Y Aoyama, K, Okada & K. Morihara. (1975). Effects of protease from *Pseudomonas aeruginosa* on skin. **Jon. J. Exp. Med.** **45**: 79-88.
- 22.- Kurioka, S. y P. V. Liu (1967). Effect of the hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and on phospholipase C activity. **J. Bacteriol.** **93**: 670-674.
- 23.- Kurioka, J. y A. M. Kropinski, (1983). O- antigen conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Bacteriophage D3. **J. Bacteriol.** **155**:203-212.
- 24.- Liu, P. V., (1974). Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Infect. Dis.,** **130**: 549-599.
- 25.- Martínez, G., S. López, S. Vaca & C. Cervantes, (1984). Aislamiento de bacteriófagos de cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. IV Coloquio de investigación. E.N.E.P.I., U.N.A.M., 26-30 nov.
- 26.- Mienke, G., J. Barum, B. Rosenberg & R. Berke, (1970). In vivo studies with partially purified protease (elastase) from *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect. Immun.** **2**:583-589.

- 27.- Middlebrook, J. & R. B. Dorland, (1977). Response of cultured mammalian cells to the exotoxins of *Pseudomonas aeruginosa* and *Corynebacterium diphtheriae*: Differential citotoxicity. **Can. J. Microbiol.** **23**:183-189.
- 28.- Montie, T. C., D. Doyle-Hutzinger, R. C. Craven and I. A. Holder (1982). Loss of virulence associated with absence of flagellum in mouse model. **Infect. and Immun.** **38**: 1296-1298.
- 29.- Morihara, K. , H. Tsuzuki & K. Oda, (1979). Protease and elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: Inactivation of human plasma alpha-1 proteinase inhibitor. **Infect. Immun.** **24**:188-193.
- 30.- Nakahara, H.A., Ishikawa, Y., Sarai, I., Kondo H., Kosukue & S. Silver, (1977). Linkage of mercury, cadmium and arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.** **33**:9975-976.
- 31.- Pavlovskis, O. R. & F. G. Gordon, (1972). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin: Effect on cell culture. **J. Infect. Dis.** **125**:631-636.
- 32.- Pavloskis, O. R., L. T. Callahan III & M. Pollack, (1975). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin. In "Microbiology 1975" (D. Schlesinger, ed.), pp 252-256. Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C.
- 33.- Pavlovskis, O. R. et al. (1978). Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in experimental mouse infections: Adenosine diphosphate ribosylation of elongation factor 2. **Infect. Immun.** **19**:29-33.
- 34.- Pollack, M., (1984). The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev. Infect. Dis.** **6**:5617-5625.
- 35.- Pruitt, B. A., (1974). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* species in patients with burns and in other surgical patients. **J. Infect. Dis.****130**: 508-513.
- 36.- Scharman, W. (1976). Purification and characterization of leucocidin from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Gen. Microbiol.** **93**: 292-302.
- 37.- Schultz, D. R., and Miller, K. D. (1974). Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: Inactivation of complement components and complement- derived chemosactic and phagocytic factors. **Infect. Immun.** **10**: 128-135.
- 38.- Stanier, R. Y. , E. A. Adelberg y J. L. Ingraham. (1984). Microbiología. 4a Ed. Eds. Reverte; Barcelona, España 836 p.
- 39.- Stent, S. G., y R. Calendar (1978). Molecular Genetics. An introductory narrative. 2a. Edic. W. H. Freeman and Co.

- 40.- Summers, A. O. & G. A. Jacoby, (1978). Plasmid determined resistance to boron and chromium compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents. Chemoter.** **13**: 637-640.
- 41.- Vaca, S., G. Martínez, D. Arenas, J. Arce & Olivier. (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 abr.
- 42.- Vaca, P S., G. Martínez, A. Cruz y J. Escobar (1988). Decresed sensivity to phagocytosis and serum bactericidal effect induced by FIZ15 bacteriophage in *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev. Lat-amer. Microbiol.** **30**:277-281.
- 43.-Vaca, S & C. Cervantes Vega (1988) Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* **Rev. Lat-amer Microbiol.****30**: 87-90
- 44.- Vaca, S., J. Arce, F. Argüello, D. Arenas y G. Olivier, (1989). FIZ15 bacteriophage increases the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells. **Rev. Lat-amer. Microbiol.** **31**: 1-5.
- 45.- Wood, R. E. , (1976). *Pseudomonas*: The compromised host. **Hosp. Pract.** **11**:91-100.
- 46.- Woods, D. E. & Iglewski, B. H., (1983). Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. New Perspectives. **Rev. Infect. Dis.** **5**:715-721.
- 47.- Wretlind, B. y O. R. Pavlovskis, (1983). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and its role in *Pseudomonas* infections. **Rev. Infect. Dis.** **5**: 998-1004.
- 48.- Zierdt, C.H., & R.J. Williams. (1975). Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis of the pancreas. **J.Lin.Microbiol.** **1**: 521-526