



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CAMPUS IZTACALA

**ESTUDIO DE LA ADHERENCIA BACTERIANA
A CELULAS BUCOEPITELIALES HUMANAS
MEDIADA POR PROFAGOS – DISEMINACION
DEL GEN RESPONSABLE *lom***

289893

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
FERNANDO FERNÁNDEZ RAMÍREZ



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS: DR. SERGIO VACA PACHECO

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO

2001



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.

DEDICATORIA

A ti mamá, *Luz*.

A ti papá, *Fernando*.

Por el gran amor, apoyo y comprensión;

Por el respeto y admiración que les tengo,

Y por ser una luz en el camino.

AGRADECIMIENTOS

Al *Dr. Sergio Vaca Pacheco* de manera especial, por brindarme la oportunidad de acercarme a la Genética; por su confianza, apoyo y enseñanzas durante todo el tiempo que estuve en su laboratorio; por ser el poeta más fagólogo de estos lares: mi admiración y agradecimiento.

Al *Dr. Diego Arenas Aranda*, por su valiosa ayuda y orientación en el desarrollo del trabajo.

Al *M. En C. Ramón Moreno Torres*, por su incondicional apoyo durante mis estudios.

A los revisores: *Dr. Diego Arenas, Dr. Sergio Vaca, Biol. Irma E. Dueñas, M. en C. Elías Piedra y M. en C. Ramón Moreno*, por sus observaciones y comentarios que enriquecieron este trabajo y mi formación profesional.

A la *Dra. Rosa María Bermúdez*, por su gran apoyo y orientación en los experimentos de PCR.

Al *Biol. José Luis López*, por las ilustrativas charlas sobre los reptiles y el sol, la vida, las mujeres, Dios, la música, las palabras, los viajes: aquí tengo la pata de iguana, hermano.

Al famoso don *O. Patricio García*, por no acaparar el material de laboratorio, no usar los medios de cultivo ajenos, no acabarse las enzimas; por sus valiosos intentos de crear super-bacterias que requieran una resiembra anual solamente; por sus conocimientos de cibernética y por la discografía completa de pink floyd.

A todos mis amigos y amigas con quienes conviví estos años en Iztacala, ustedes saben quiénes son... gracias por su amistad. Salud!!

ESTE TRABAJO DE TESIS FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE GENETICA DE LA UNIDAD DE MORFOLOGIA Y FUNCION DE LA UNAM CAMPUS IZTACALA, BAJO LA DIRECCION DEL DR. SERGIO VACA PACHECO, Y CON FINANCIAMIENTO DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE APOYO AL PERSONAL ACADEMICO (PROYECTO DGAPA IN206597), ASI COMO CON EL APOYO DEL PROGRAMA DE BECAS DE TESIS DE LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN (PROYECTO "CARACTERIZACION DE BACTERIOFAGOS").

INDICE

	Página
INDICE DE TABLAS	VI
INDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	VIII
INTRODUCCIÓN	1
Justificación y antecedentes	13
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y METODOS	16
Medios de cultivo y soluciones	16
Bacterias y bacteriófagos	16
Obtención de lisados	17
Titulación de lisados	18
Construcción de lisógenas	18
Análisis de inmunidad	19
Ensayo de adhesión bacteriana a CBH	19
Extracción de ADN fágico	20
Amplificación de secuencias por PCR	21
Restricción de ADN	23
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	40
REFERENCIAS	41

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Algunos ejemplos de conversión lisogénica.	8
Tabla 2. Familia de genes OMP.	10
Tabla 3. Colifagos silvestres utilizados en este estudio.	17
Tabla 4. Condiciones de PCR para la amplificación del gen <i>lom</i> .	23
Tabla 5. Lisógenas construidas.	24
Tabla 6. Inmunidad de los fagos FIZ15 y D3 en las lisógenas para PAO1.	25
Tabla 7. La región <i>b</i> de λ está implicada en el incremento en la adhesión de <i>E. coli</i> a CBH a 30° C.	26
Tabla 8. Adhesión de <i>E. coli</i> y sus lisógenas a CBH, a 18° C.	27
Tabla 9. Adhesión de <i>P. aeruginosa</i> y sus lisógenas a CBH, a 18° C.	28

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema del bacteriófago T4.	1
Figura 2. Ciclos de vida del bacteriófago λ .	2
Figura 3. Expresión de proteínas relacionadas con el ciclo lítico.	3
Figura 4. Expresión de genes para el establecimiento de la lisogenia.	4
Figura 5. El represor cI mantiene el estado lisogénico.	4
Figura 6. Micrografía electrónica del bacteriófago λ .	7
Figura 7. Secuencia nucleotídica del gen <i>lom</i> del fago λ .	22
Figura 8. Electroforesis del ADN extraído de colifagos silvestres.	29
Figura 9. Electroforesis del ADN fágico (técnica estandarizada).	29
Figura 10. Amplificación del gen <i>lom</i> por PCR – I.	30
Figura 11. Amplificación del gen <i>lom</i> por PCR; temperatura de alineamiento: 50° C.	31
Figura 12. Amplificación del gen <i>lom</i> por PCR – II.	32
Figura 13. Amplificación del gen <i>lom</i> por PCR – III.	33
Figura 14. Restricción de productos de PCR con <i>Sma</i> I.	34

RESUMEN

La conversión lisogénica se define como la adquisición bacteriana de nuevas características fenotípicas mediada por un profago. Se ha reportado previamente que los bacteriófagos λ , FIZ15 y D3 incrementan la adhesión de sus lisógenas a células bucoepiteliales humanas (CBH); en *Escherichia coli* este fenotipo es conferido por el gen *lom* del profago λ , cuyo producto podría participar directamente en la adhesión (de forma estructural, semejante a los pili bacterianos) o regulando la síntesis de otra(s) proteína(s) que participan en la adhesión. Con el fin de determinar si la función de la proteína de membrana Lom es inhibida por el crecimiento de las lisógenas a bajas temperaturas, como sucede con los pili bacterianos, en este trabajo se estudió la adherencia de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y sus lisógenas respectivas para λ , FIZ15 y D3, a CBH a 18° C. Los resultados mostraron que en *E. coli* la adhesión via pili resultó inhibida, mientras que el mecanismo de adherencia conferido por el profago λ a su lisógena no se vió afectado por las bajas temperaturas; de esta forma se pudo disociar ambos mecanismos de adhesión. En contraste, la adherencia de *P. aeruginosa* a CBH no se vió afectada por el crecimiento bacteriano a bajas temperaturas, y tampoco fue afectado el mecanismo conferido por D3 y FIZ15. Considerando la ventaja selectiva que podría conferir el gen *lom* a los bacteriófagos y a sus lisógenas, se analizó también la diseminación de secuencias relacionadas con *lom* en una colección de colifagos silvestres representativos de distintos grupos de inmunidad, así como en los fagos D3 y FIZ15; para esto se realizaron PCRs utilizando oligonucleótidos específicos para *lom*, y como molde el ADN de cada fago. Se encontraron secuencias amplificadas con un tamaño correspondiente a *lom* (702 pb) en 5 colifagos silvestres, así como en los fagos FIZ15 y D3. Dado que estos 2 últimos fagos confieren un incremento en la adhesión de su lisógena a CBH, se sugiere que las bases genéticas de esta conversión lisogénica son similares a las de λ y *E. coli*.

INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos, o fagos, son virus que infectan bacterias; son parásitos intracelulares obligados a nivel genético, ya que requieren de la maquinaria de replicación, transcripción y traducción bacteriana para multiplicarse. Han sido un importante modelo de estudio para la genética y biología molecular desde su descubrimiento por Twort en 1915 y D'Herelle en 1917, y actualmente desempeñan un papel preponderante en el desarrollo de estas ramas.

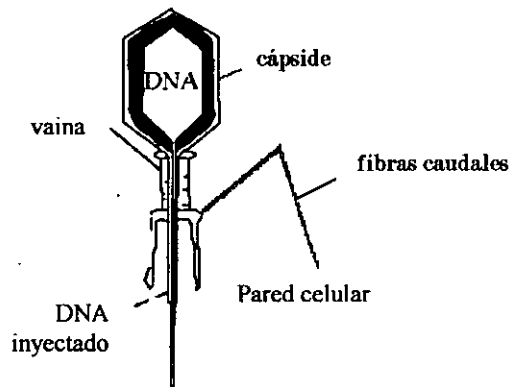


Figura 1. Esquema del bacteriófago T4.
Tomado de Wood y Edgar, Scientific American, 1967.
http://www.salsgiver.com/people/forrest/fig_5.html

Los fagos presentan ciclos de *vida* definidos: la primera etapa, *infección*, comienza por la colisión azarosa entre fagos y bacterias, que resulta en la adsorción del fago a un receptor específico de la superficie bacteriana por una reacción de afinidad estereoquímica. Posteriormente, el fago inyecta su ADN mediante un proceso complejo, que incluye la contracción de la vaina que rodea la cola viral (en el caso de T4, figura 1); el ADN es introducido de manera lineal al interior de la bacteria, donde dirige la síntesis de proteínas estructurales fágicas y su propia replicación, cuyos

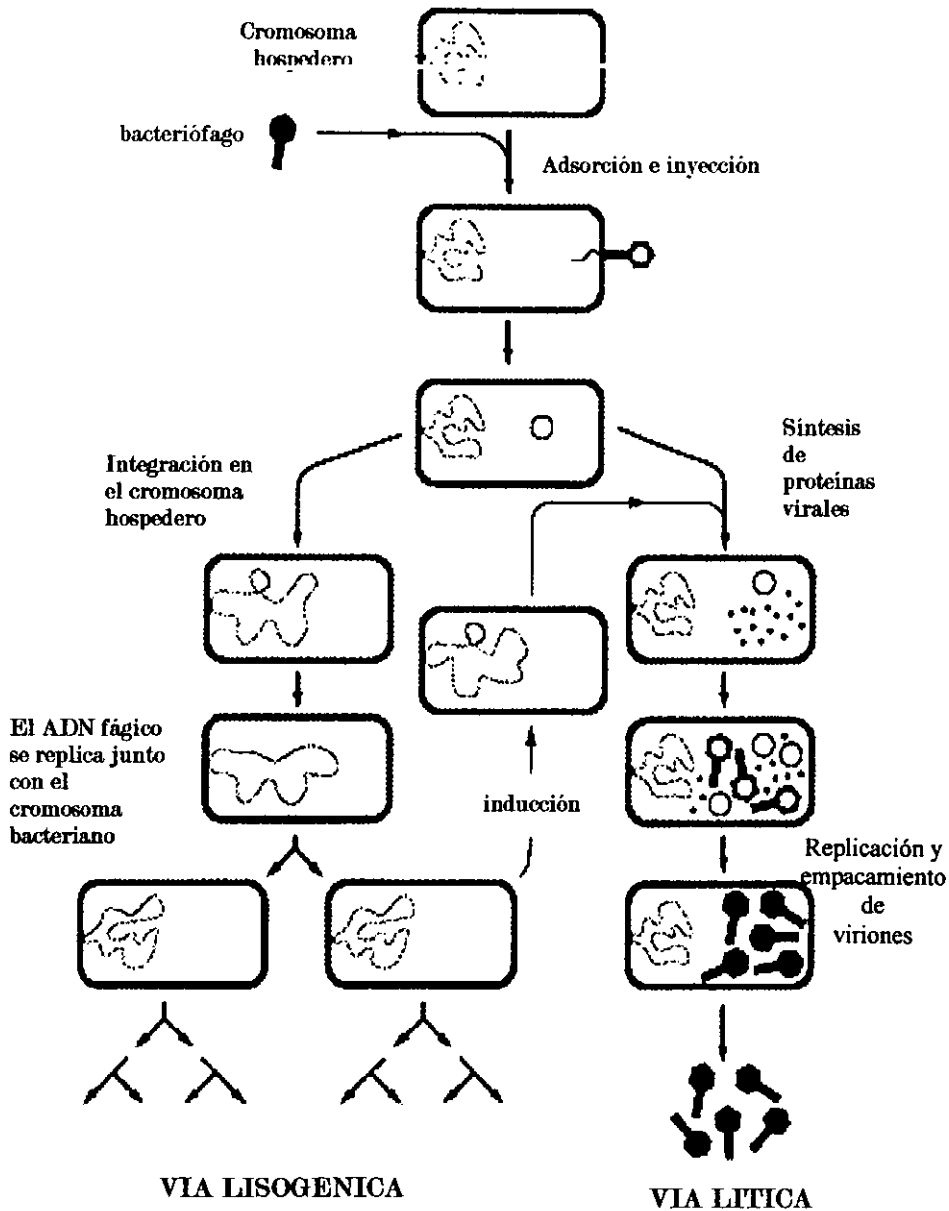


Figura 2. Ciclos de vida del bacteriófago λ . Tomado de Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter; © 1998, Pittsburgh University. http://www.accessexcellence.com/AB/GG/bact_Lambda.html

productos se encapsidarán para formar los nuevos viriones. Estos serán liberados (*eclosión*) al lizarse la bacteria por la acción de enzimas hidrolíticas, también codificadas por el genoma viral, y pueden reiniciar el ciclo infectando otras bacterias. A este proceso se le conoce como vía lítica (Figura 2). Los genes cuyos productos son determinantes del desarrollo de esta vía, se esquematizan en la Figura 3, y son principalmente las proteínas Cro y las antiterminadoras N y Q.

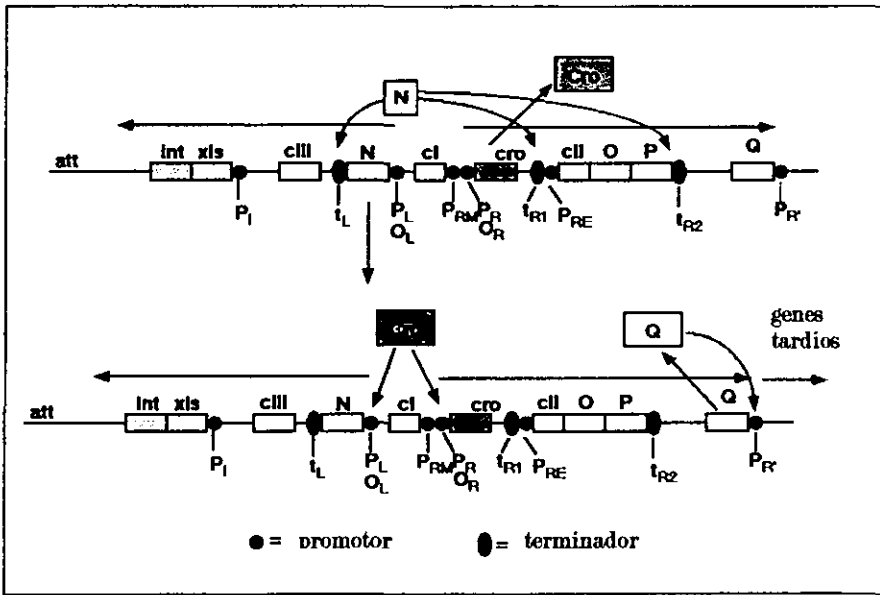


Figura 3. Expresión de proteínas relacionadas con el ciclo lítico. Durante la transcripción temprana (arriba) se transcribe Cro, el cual reprimirá la transcripción a partir de P_{RM} (inhibiendo a CI), P_R y P_L ; una vez producido el antiterminador N temprano, se transcriben los genes a la derecha de P_R , entre ellos el antiterminador Q, que permite la transcripción de genes tardíos (vía lítica) a partir de $P_{R'}$.

Algunos fagos, llamados temperados, como λ de *Escherichia coli* ó D3 que infecta a *Pseudomonas aeruginosa*, presentan un ciclo de vida alternativo, denominado vía lisogénica (Figura 2). Esta ocurre de manera similar a la vía lítica, en cuanto a la infección e inyección, pero el ADN fágico se incorpora al cromosoma bacteriano. Sin embargo, la expresión de los genes estructurales, así como la replicación del ADN fágico, son reprimidas por la acción de proteínas reguladoras (represoras) codificadas por el mismo genoma viral (Figura 4). El ejemplo más estudiado es el represor C_1 del fago λ de *E. coli*, y también los represores del colifago 434 y el fago P22 de *Salmonella typhimurium*; a pesar de que estas proteínas presentan homología poco significativa al compararlas entre sí, poseen similitudes significativas en su mecanismo de represión (Farinha y Kropinski, 1997). De esta forma, durante la lisogenia se expresa el gen que mantiene reprimidos los genes del ciclo lítico estructurales y de lisis (Figura 5) quedando integrado en el cromosoma de manera estable el ADN viral, el cual en esta condición es denominado profago; a la bacteria que lo porta se le llama lisógena.

Algunos profagos se replican pasivamente como parte del cromosoma bacteriano, heredándose a las células hijas, mientras que otros permanecen en la bacteria a manera de plásmidos, replicándose de forma autónoma. El profago mantiene su estabilidad por la expresión en exceso del represor, de manera que si un fago de la misma inmunidad (mismos operadores y represores) infecta a la bacteria, su ADN es reprimido inmediatamente, y no puede entrar a la vía lítica ni lisogénica, y se pierde por dilución a medida que el cultivo crece.

La vía lisogénica se puede revertir a vía lítica, mediante el proceso de inducción, en el cual el profago es conducido al crecimiento lítico por agentes físicos, como radiación UV, o químicos (p.e. mitomicina C) que de manera

general dañan al ADN o interfieren con su replicación. Estas situaciones comprometen la sobrevivencia de la bacteria, y ésta presenta una serie de respuestas, conocida como sistema SOS, en la cual se degradan ciertos represores, entre ellos el represor del genoma viral. Esta inducción requiere que el fenotipo de el hospedero lisógeno sea RecA⁺ (Miller y Kokjohn, 1987). Cabe mencionar que durante la lisogenia, la represión falla a baja frecuencia (10⁻⁶), lo que ocasiona que haya fagos libres, y también puede haber desrepresión transitoria, que puede originar bacterias libres del profago o curadas. Así, de manera general, la lisogenia se caracteriza por 4 propiedades: heredabilidad, inducibilidad, inmunidad y curabilidad.

El principal prototipo de fagos temperados es λ , que constituye una herramienta importante para la biología molecular y fue obtenido originalmente de un aislado clínico de *E. coli*. λ es un fago de doble cadena de ADN de 48.502 pb, con cabeza isométrica de 50 nm de diámetro y cola flexible de 150 nm de longitud (Hendrix *et al*, 1983) (figura 6), perteneciente a la familia *Siphoviridae*; generalmente el fago λ infecta a *E. coli* tipo K, y el receptor que utiliza para su adsorción es la proteína de unión a maltosa. Su molécula de ADN es lineal, y tiene extremos cohesivos de 12 pb con los cuales se circulariza durante ciertas fases de su actividad viral (Hendrix *et al*, 1983). Su forma de ensamblaje es por separado colas y cápside, en la cual se empaca el ADN y se unen las colas preformadas (Casjens y Hendrix, 1988).

El fago λ también es un importante modelo de estudio para la transducción especializada y los episomas, así como la regulación genética. Actualmente se utilizan varias cepas de λ como vectores de clonación y expresión, usualmente para la construcción de librerías genómicas.



Figura 6. Micrografía electrónica del bacteriófago λ . Tomado de Robert Duda, Pittsburgh University. <http://www.asmtusa.org/division/m/foto/UrLamMic.html>

Los fagos pueden modificar a la bacteria, pero no solo por el desarrollo de la vía lítica o lisogénica, sino que también pueden proporcionarle nuevas características fenotípicas, mediante los procesos de transducción y conversión lisogénica.

La transducción es la transferencia de material genético en las bacterias, mediada por fagos, generalmente temperados. Puede ser de dos tipos: *generalizada*, cuando el fago transductor acarrea cualquier segmento del cromosoma bacteriano de una célula donadora a otra receptora, perdiendo el ADN propio, por lo que el fago es incapaz de producir progenie y solamente sirve como vehículo, y *especializada*, cuando se transducen los segmentos cercanos al sitio de integración del profago en el cromosoma bacteriano; al escindirse el profago, lo hace de forma aberrante, perdiendo algunos genes no esenciales para su multiplicación e incorporando segmentos del ADN bacteriano. Cuando el fago infecta a otra bacteria, le adiciona dichos segmentos al integrarse su ADN en el cromosoma de ésta.

La conversión lisogénica se define como la adquisición bacteriana de nuevas características fenotípicas, mediada por un profago. Estas nuevas características pueden oscilar desde el nivel morfológico hasta el nivel funcional, como la producción de toxinas, adquisición de rutas metabólicas o de propiedades de virulencia bacteriana (Tabla 1).

Se ha sugerido que la persistencia de estos genes en los genomas virales le confiere ventaja evolutiva a los bacteriófagos, quizá debido a la ventaja selectiva de las bacterias que poseen estos determinantes de virulencia (Chetham y Katz, 1995). Entre los genes fágicos de virulencia bacteriana que se han descrito, se encuentra el gen *bor* del bacteriófago λ , que le confiere a su lisógena resistencia al efecto bactericida del suero (Barondess y Beckwith, 1990), así como el gen *lom* del mismo fago, del cual se ha reportado recientemente un probable rol en el incremento de la

Bacteriófago	Gen	Fenotipo	Referencia
H19B 933J	<i>tox1, tox2</i> (<i>SLT-1</i>)	Producción de toxina Shiga-like 1 en <i>Escherichia coli</i> .	Huang <i>et al</i> , 1987; O'Brien <i>et al</i> , 1984.
Tipo 42-D *	<i>entA, sak</i>	Producción de enterotoxina A y estafilocinasa, e inactivación de β -lisina en <i>Staphylococcus aureus</i> .	Coleman <i>et al</i> , 1989.
CTX Φ	Región <i>ctx</i>	Producción de toxina del cólera, en <i>Vibrio cholerae</i> .	Waldor y Mekalanos, 1996.
λ	<i>bor</i>	Resistencia al efecto bactericida del suero de mamífero, en <i>E. coli</i> .	Barondess y Beckwith, 1994.
λ	<i>lom</i>	Incremento en la adhesión de <i>E. coli</i> a células bucoepiteliales humanas.	Vaca <i>et al</i> , 1997.

Tabla 1. Algunos ejemplos de conversión lisogénica.*Se han identificado varios fagos pertenecientes al serotipo F, que no han sido cabalmente caracterizados.

adhesión bacteriana a células bucoepiteliales humanas (CBH) (Vaca *et al*, 1997): el gen *lom* forma parte de una familia de cinco genes que codifican para proteínas de membrana externa. Tanto *bor* como *lom*, son dispensables para el crecimiento vegetativo del fago λ en condiciones de laboratorio, por lo que se incluyen dentro de los genes llamados accesorios, y están relacionados con proteínas de virulencia bacteriana, localizadas en membrana externa (Barondess y Beckwith, 1995).

El gen *lom* fue descrito en 1979 y codifica para una proteína de aproximadamente 20.5 kDa que se localiza en la membrana externa de *E. coli* (Reeve y Shaw, 1979). Debido a que en una lisógena el promotor viral P_R^- no es activo por la ausencia de la proteína Q, que no se sintetiza debido a la carencia de la proteína N (cuya expresión a partir de P_L está reprimida por la proteína cI), se sugiere fuertemente que *lom* se expresa en la lisógena a partir de un promotor localizado en la región *b*. El gen *lom* forma parte de una familia de cinco genes que codifican para proteínas de membrana externa. Esta familia incluye a los genes *rck* y *pagC* (Heffernan *et al*, 1992; Pulkkinen y Miller, 1991) de *Salmonella typhimurium*, al gen *ail* de *Yersinia enterocolitica* (Miller *et al*, 1990) y al gen *ompX* de *Enterobacter cloacae* (Stoorvogel *et al*, 1991). Los genes *rck*, *pagC* y *ail* confieren propiedades de virulencia, como se muestra en la Tabla 2; se ha propuesto que el ancestro de la familia es *lom*.

La colonización bacteriana de un epitelio depende de la capacidad de dichas bacterias para adherirse a la superficie celular, y esto lo logran mediante los pili o fimbriae, que son apéndices proteínicos formados por monómeros de pilina en su superficie (Doig *et al.*, 1990). Estos pili son estructuras filamentosas polares, encontrados en una amplia variedad de bacterias patógenas, y tanto su biogénesis como su función se consideran extremadamente complejas, incluyendo la expresión y regulación coordinada de un gran número de genes (Alm y Mattick, 1997).

Gen	Bacteria	Localización	Fenotipo	Referencia
<i>Rck</i>	<i>S. typhimurium</i>	Plásmido	Resistencia al suero	Heffernan <i>et al</i> , 1992
<i>Ail</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	Cromosoma	Adhesión e invasión	Miller <i>et al</i> , 1990
<i>PagC</i>	<i>S. typhimurium</i>	Cromosoma	Virulencia en ratón	Miller <i>et al.</i> , 1989
<i>OmpX</i>	<i>E. cloacae</i>	Cromosoma	?	Stoorvogel <i>et al</i> , 1991
<i>Lom</i>	<i>E. coli</i>	Fago λ	Adhesión	Vaca <i>et al</i> , 1997

Tabla 2. Familia de genes OMP

Dichos apéndices se unen a proteínas de superficie de células epiteliales humanas y a otros tipos celulares; estudios amplios sugieren que las glicoproteínas y algunos glicoesfingolípidos funcionan como receptores de estos pili (Hahn, 1997). Este mecanismo de adherencia bacteriana parece estar ampliamente conservado y distribuido: a pesar de que la variación en la secuencia de residuos aminoácidos de pilina es sustancial, por ejemplo entre varias cepas de *P. aeruginosa*, ciertas regiones se encuentran conservadas considerablemente (Doig *et al*, 1990).

Existen otros mecanismos de adhesión bacteriana, como la adhesión específica a mucina, gracias a la proteína de la envoltura flagelar FliD (Arora *et al*, 1998), la adhesión a células de fibrosis quística mediada por ligandos compuestos por polisacáridos neutros asociados con alginato (Marty *et al*, 1998); todos estos mecanismos estudiados en *P. aeruginosa* principalmente.

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista, el principal agente de mortalidad y morbilidad en pacientes inmunocomprometidos (Wang *et al*, 1996); es un importante patógeno de las vías respiratorias (Doig *et al*, 1990) y también es un agente causal de otitis externa (Sundstrom *et al*, 1997). Por otro lado, *Escherichia coli* es una bacteria entérica de mamíferos, parte de la flora intestinal; sin embargo, existen algunas cepas productoras de enterotoxinas causantes de diarrea e infecciones gastrointestinales. Tanto *E. coli* como *P. aeruginosa* utilizan mecanismos de adhesión mediados por pili, y se ha reportado que en *E. coli*, el crecimiento a 18° C inhibe la síntesis y/o el ensamblaje de las subunidades de los pili tipo K99, así como de otros tipos de pili (Isaacson, 1977, 1980, 1983). Por esto, su capacidad de adherencia vía pili se abate durante el crecimiento a bajas temperaturas.

El fago D3 de *Pseudomonas aeruginosa* es del tipo temperado, y pertenece a la misma familia de λ (*Siphoviridae*), con el cual comparte una organización genética similar (Farinha y Kropinski, 1997). El virión D3 es complejo, tiene una cabeza poliédrica, una cola prominente con seis proyecciones y en el interior de la cápside una molécula lineal de ADN dúplex, de aproximadamente 60 kpb (Miller y Kokjohn, 1987). Su modo de integración al genoma hospedero corresponde al modelo propuesto por Campbell en 1962, y su escisión puede resultar en partículas de transducción especializada (Cavanagh y Miller, 1986). Estudios de secuencia han revelado la presencia de un marco de lectura abierto (ORF) capaz de codificar una proteína tipo represor de 223 residuos aminoácidos; este ORF está estructurado con elementos reguladores de una manera similar a la de fagos lambdoides (Farinha y Kropinski, 1997). El represor que mantiene la lisogenia del fago, pertenece al grupo de represores sensibles a Rec A, que controlan la lisogenia de fagos lambdoides. Así, es probable que estos fagos se hayan originado a partir de un ancestro común, han conservado poca homología a nivel de ADN, pero mantienen un sistema represor

funcionalmente homólogo que se relaciona al altamente conservado sistema SOS celular (Farinha y Kropinski, 1997).

Además de esto, D3 es un fago serotipo-convertidor, causando cambios en las unidades repetidas de trisacárido del antígeno O (Kuzio y Kropinski, 1983), su propio receptor. Se ha reportado que este fago incrementa la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 al efecto bactericida del suero mamífero (Holloway *et al*, 1962) y su adhesión a células bucoepiteliales humanas (Vaca *et al*, 1999).

El fago temperado FIZ15, aislado clínicamente, causa conversión lisogénica en *P. aeruginosa* PAO1 (Vaca *et al.*, 1999). Cuando FIZ15 lisogeniza a PAO1, reduce la sensibilidad de ésta al efecto bactericida del suero humano, y también incrementa la adhesión a células bucoepiteliales humanas (CBH) de dicha lisógena (Vaca *et al.*, 1999). Estos fenotipos son originados por un cambio en la superficie bacteriana inducido por el profago, aparentemente a nivel del antígeno O: la lisógena PIZ15 no permite la adsorción de D3 ni FIZ15, y una mutante espontánea de PAO1 obtenida por Vaca *et al.*, 1993, que no permite la adsorción de ninguno de los fagos mencionados, sí presenta los fenotipos de adhesión incrementada y resistencia al efecto bactericida del suero humano.

El fago λ y los fagos lambdoides, comparten una organización genómica común. Esto incluye fragmentos genéticos homólogos, la regulación genética, exclusión fágica, replicación, lisis celular y las proteínas estructurales para cabeza y cola. Esta organización genética conservada ha facilitado la recombinación entre los fagos lambdoides, conduciendo a un gran número de híbridos en el ambiente natural. Una forma de clasificación agrupa los fagos que pueden recombinar entre sí, produciendo progenie infectiva, clasificadolos así como fagos lambdoides

De manera similar, los fagos D3 y λ tienen varias características comunes. Ambos son temperados, se integran en un sitio específico del cromosoma y son transductores especializados (Cavenagh *et al*, 1986); sin embargo, usan diferentes receptores y D3 no infecta a *E. coli*, ni λ a *P. aeruginosa*. Sus ácidos nucleicos no muestran homología detectable por hibridación y ambos tienen distintos mapas de restricción. A pesar de estas diferencias, algunos procesos parecen comunes; uno de estos es la represión: el análisis de la secuencia de ADN de la región de inmunidad de D3 muestra una gran similitud con λ en la organización de promotores y operadores (Farinha *et al*, 1994).

JUSTIFICACION

Todas las alteraciones superficiales conferidas por λ , D3, FIZ15 u otros fagos, pueden jugar un papel importante en la selección natural de fagos y bacterias en los hospederos animales. Debido a esta ventaja selectiva, el gen *lom* podría estar ampliamente distribuido entre los fagos temperados, como lo sugiere un trabajo previo en el que se aislaron 10 fagos silvestres los cuales poseen secuencias relacionadas con *lom* (Vaca, 1998). Debido a esto, en este trabajo se propone el estudio de la conversión lisogénica, en cuanto a los factores de virulencia desarrollados por la bacteria lisógena, esencialmente, la adhesión a células bucoepiteliales humanas (CBH).

Se sabe que *lom* se expresa en las lisógenas y codifica una proteína de membrana externa, la cual está presente en bajo número de copias (alrededor de 100 moléculas por célula). Esta condición permite teorizar que su papel en la adhesión a CBH no es estructural, sino catalítico (Vaca, 1999). Por otro lado, reportes previos indican que la síntesis y/o ensamblaje de varios tipos de pili en *E. coli* queda inhibida a 18°C (Strom y Lory, 1993).

Considerando estos antecedentes, en este trabajo se ha planteado el estudio del fenómeno de adhesión a 18° C en *E. coli* y sus lisógenas, para determinar si el mecanismo conferido por los profagos es afectado por las bajas temperaturas, presentando en tal caso un comportamiento similar al de los pili; esto podría dirigir los estudios hacia la elucidación de un modelo de función de Lom, en el cual su papel sea estructural, p.e. en la formación de una especie de pili en la membrana. De manera contraria, como se ha referido, la función de Lom podría ser catalítica tanto en la membrana externa, como en la posible regulación de la expresión de otras proteínas involucradas en la adhesión, o simplemente una función no afectada por el crecimiento a bajas temperaturas. Adicionalmente, en este trabajo se pretende determinar si en *P. aeruginosa* se presenta un mecanismo bacteriano y profágico similar.

Tomando en cuenta estos fenotipos, así como el aspecto evolutivo y ecológico, se plantea también la búsqueda de secuencias homólogas al gen *lom* de λ , mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y así evaluar el grado de diseminación de estos genes en el ambiente natural, dada su ventaja selectiva. Sería conveniente también, buscar estas secuencias relacionadas en los fagos D3 y FIZ15, para tratar de establecer si las bases genéticas de la conversión en *E. coli* y *P. aeruginosa* son similares.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar de manera comparativa la adhesión a CBH a 18°C de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y sus respectivas lisógenas para λ , y FIZ15 y D3, y analizar la diseminación del gen responsable (*lom*) en estos fagos, así como en 20 colifagos silvestres representativos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Construcción de lisógenas de *E. coli* para los fagos λ , $\lambda_{plac5cl_{857}}$ y para 20 colifagos silvestres, y construcción de lisógenas de *P. aeruginosa* para los fagos FIZ15 y D3.
2. Corroboración de los grupos de inmunidad de FIZ15 y D3, así como de los 20 colifagos silvestres, mediante ensayos de plaqueo.
3. Ensayos de adhesión a CBH a 30° C de *E.coli* y sus lisógenas, y a 18°C de *E. coli* , *P. aeruginosa*, y las lisógenas descritas.
4. Extracción de DNA fágico.
5. Amplificación de secuencias homólogas a *lom*, mediante PCR.
6. Restricción de los productos de PCR.

MATERIAL Y METODOS

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Los medios utilizados para crecer las bacterias se obtuvieron de Merck y Bioxon de México. Estos fueron: Caldo nutritivo (CN) y Agar nutritivo (AN) para *E. coli*; Caldo de soya y tripticaseína (CST) y Agar de soya-tripticaseína (AST) para *P. aeruginosa*, Agar McConkey (AMC) para *E. coli* W3110 y lisógena de $\lambda_{plac5cl857}$. El agar suave (AS) para plaquear los fagos fue CN o CST con 0.6 % de agar bacteriológico. Medio mínimo: M63 (sales) al 2X, se esteriliza y se mezcla con agar-agar 2X a 45°C, se utilizó para cultivos iniciales de *P. aeruginosa*. Los experimentos de adhesión se realizaron en buffer Tris-HCl 0.1 N, pH 7.2 (Sigma Chemical Co.). Buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM EDTA); Solución de precipitación para fagos: Polietilenglicol 8000 al 20% en NaCl 2.5 M). Las preparaciones de fagos para extracción de ADN se realizaron en placas y agar suave, en los que se sustituyó el agar bacteriológico por agarosa. SM (NaCl 0.58 g, MgSO₄ 0.2 g, 5 ml Tris-HCl 1 M pH 7.5, 0.5 ml gelatina 2% se aforan a 100 ml y se esteriliza). TBE 5X (54 g Tris-base, 27.5 g ácido bórico, 20 ml 0.5 M EDTA pH 8, se aforan a un litro).

BACTERIAS Y BACTERIOFAGOS

Las cepas de *Escherichia coli* K12 utilizadas en este trabajo fueron C600 (donada por G. Guarneros, CINVESTAV, México), W3110 (donada por L. Kameyama, CINVESTAV, México), AB1157 y AB1157 λ^+ (donadas por J. Beckwith, Harvard Medical School, U.S.A.). Los bacteriófagos de *E. coli* fueron: λ^+ , $\lambda_{plac5cl857}$ (G. Guarneros). Los 20 colifagos silvestres representativos fueron proporcionados por el Dr. Kameyama; Estos fagos clasificados por grupo de inmunidad, se muestran en la Tabla 3; el grupo de

inmunidad I representa fagos identificados como no-lambdoides, mientras los 19 restantes son fagos lambdoides

La cepa PA01 de *Pseudomonas aeruginosa* y el bacteriófago temperado D3, fueron donados por B.W. Holloway, Monash University, Australia. El fago FIZ15 fue aislado a partir de una cepa clínica de *P. aeruginosa* por S. Vaca, U.N.A.M. Iztacala.

OBTENCION DE LISADOS

Para obtener los lisados de fagos, se generaron placas aisladas de cada uno, en medio sólido. Posteriormente mezcló una placa de cada fago en 10 ml de CN y 0.2 ml de bacteria sensible; esta mezcla se incubó a 150 rpm a 37° C,

Grupo de inmunidad	Bacteriófago
I	mEp 038
II	mEp 003
III	mEp 023
IV	mEp 043
V	mEp 064
VI	mEp 167
VII	mEp 173
VIII	mEp 174
IX	mEp 213
X	mEp 237
XI	mEp 390
XII	mEp 410
XIII	mEp 457
XIV	mEp 460
XV	mEp 506
XVI	mEp 505
XVII	mEp 535
XVIII*	W-1, mEp 123
XIX	φ80
XX	HK022

Tabla 3. Colifagos silvestres utilizados en este estudio. mEp = fagos mexicanos de *E. coli* (Kameyama et al, 1999). * = Inmunidad de λ.

hasta lisis (3-6 hrs). Al término de esta incubación, se agregaron unas gotas de cloroformo y se incubó durante 15 minutos más. se centrifugó a 5000 rpm/15 min, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril, para su almacenamiento a 4° C, añadiéndole una gota de cloroformo.

TITULACION DE LISADOS

Se sembró una asada de bacteria sensible y se dejó crecer 12-16 hrs en agitación a 37° C. Posteriormente se hicieron las diluciones 10⁻⁶ y 10⁻⁷ de cada stock de fago en CN, y se tomó 0.1 ml de cada dilución, mezclando con 0.2 ml de bacteria sensible y 3 ml de AS; se agitó y vació en placas de AN, y se incubaron a 37° C/12 hrs. Al término, se contó el número de placas de cada dilución, y se estimó el título por la siguiente fórmula (ufp= unidades formadoras de placa):

$$\text{ufp/ml} = (\text{no. placas})/(\text{vol})(\text{dil})$$

CONSTRUCCION DE LISOGENAS

Para obtener lisógenas de cada uno de los fagos, se realizó un plaqueado del fago en un tapiz de bacteria sensible (*Escherichia coli* C600, AB1157 y W3110, y *Pseudomonas aeruginosa* PA01), en agar suave. Tras la aparición de placas aisladas, se picó con un palillo estéril el halo de lisis de una placa turbia y se transfiere a agar nutritivo, incubando a 37°C toda la noche. El estado lisogénico de cada candidata se determinó por inmunidad a la superinfección por el mismo fago, y su estabilidad se determinó por liberación espontánea (aparición de halo de lisis) al inocular la lisógena sobre un tapiz de la cepa sensible. Este procedimiento se realizó tres veces consecutivas.

ANALISIS DE GRUPOS DE INMUNIDAD

Los bacteriófagos se agrupan y diferencian por el grupo de inmunidad al que pertenecen. Para corroborar la clasificación de los fagos utilizados, se determinó la inmunidad de cada lisógena a cada fago. Esto se realiza cultivando la bacteria lisógena en CN ó CST a 37° C, toda la noche. Posteriormente se hizo un tapiz añadiendo 0.2 ml de bacteria sensible y 3 ml de agar suave, y se gotearon 10 µl de cada fago a títulos de 10⁻³. Se incubó toda la noche a 37° C y se analizó la formación de halo de lisis para cada fago. Este procedimiento se repitió 3 veces para cada lisógena.

ENSAYO DE ADHESION BACTERIANA A CELULAS BUCOEPITELIALES HUMANAS (CBH)

La adhesión bacteriana a CBH se realizó por una modificación de los métodos descritos por Woods (1980) y Reid (1983), citada en Vaca, 1997:

Las CBH se obtuvieron de donadores adultos sanos, por raspado de la mucosa oral (carielo) con hisopos estériles. Dichas células se lavaron tres veces con Tris-HCl 0.1M pH 7.2 para eliminar las bacterias indígenas, y se colectaron por centrifugación a 1500 rpm durante 15 minutos. La suspensión celular se ajustó a 5(10⁵) CBH/ml, por cuenta en cámara de Neubauer.

Las bacterias utilizadas para el ensayo de adhesión se crecieron a 30° C en agar de soya-tripticaseína, y se colectaron por raspado con espátula de vidrio. La suspensión se lavó tres veces con Tris-HCl 0.1 M pH 7.2, y se ajustó a 5(10⁶) bacterias/ml, por medición de absorbancia a 590 nm.

Para el ensayo de adhesión se mezcló 1 ml de CBH con 1 ml de la suspensión bacteriana, y la mezcla (1:100, CBH:bacterias) se incubó en un baño con agitación orbital a 20 rpm durante 2 horas a 30° C. Posteriormente se lavó la mezcla tres veces con Tris-HCl 0.1M pH 7.2 para eliminar las bacterias no adheridas. Después del primer lavado se agregaron dos gotas de eritrosina B 0.4%, y una alícuota de la suspensión final se utilizó para preparar un frotis, que se contratiñó con azul de metileno al 0.4%. El frotis se examinó por microscopía óptica, registrando el número de bacterias adheridas a cada una de 40 CBH. En cada experimento se incluyó un control de CBH al cual no se le adicionó bacteria alguna, para estimar el número de bacilos indígenas adheridos.

La temperatura en los ensayos fue modificada en los pasos del cultivo bacteriano e incubación de CBH/bacterias, a 18 °C según los objetivos planteados. Los pasos de colección y lavados en estos ensayos, se realizaron a baja temperatura (4° C).

EXTRACCION DE DNA FAGICO

Para la extracción de DNA fágico, se siguió la metodología de lisados de placa confluyente en medio sólido de agarosa, descrita en Sambrook *et al*, 1989 (plate lysate stocks); dicha técnica proporciona stocks de fago con un alto título (10^{10}): Se inocularon 10^5 ufp (o 1/20 de una placa resuspendida en SM) con 100 μ l de bacteria sensible, y la mezcla se incubó por 20' a 37° C; posteriormente se plaqueó la mezcla con 3 ml AS sobre medio sólido, a temperatura ambiente. Las placas se incubaron hasta lisis total (alrededor de 8 hrs): cada placa de fago debe rozar ligeramente las de su alrededor (placas confluentes). Posteriormente se añadieron 5 ml de SM y se incubaron las placas a 4° C durante varias horas (aprox. 6), con agitación intermitente. Al término, la suspensión se colectó con pipeta y se añadió 1 ml más de SM a

las placas (en posición inclinada); se dejó 5' a 4°C y se recuperó. A este lisado se añadieron 100 ml de cloroformo. dejándose incubar 15' a 37° C. v posteriormente se centrifugó por 10' a 4°C a 14 krpm; el sobrenadante se recuperó en tubos nuevos y se tituló, esperando 10⁹ ufp/ml como mínimo para su precipitación. Para esto, a cada lisado se añadió solución de precipitación y se dejó toda la noche a 4°C; posteriormente, se centrifugó durante 20'a 4° C a 14 krpm y se eliminó por completo el sobrenadante, dejando de cabeza los tubos sobre una superficie absorbente estéril para asegurar que no quedaran restos.

Posteriormente se procedió a la extracción de ADN, resuspendiendo las pastillas en 100 µl TE y añadiendo 100 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1); se mezcló en vortex, centrifugó, y transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Este paso se repitió una segunda vez, y posteriormente se precipitó la fase acuosa con 1/10 de acetato de Na 3M pH 5.8 y 2.5 vol. etanol absoluto durante 1 hr mínimo a -40° C, como se describe en BioTechniques (1993); se centrifugó a 14 krpm/20'/4° C y la pastilla de ADN se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril. La calidad y concentración de los DNAs se analizó en geles de agarosa al 0.8% (80 volts, durante aproximadamente 2 horas).

AMPLIFICACION DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A *lom*, MEDIANTE PCR.

Para amplificar el gen *lom* de λ y los putativos genes homólogos en D3 , FIZ15, y los 20 fagos lambdoides silvestres, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con oligonucleótidos diseñados para amplificar a partir del segundo codón y el último codón transcritos del gen (amino-terminal y carboxilo-terminal en la proteína) como se muestra en la Figura 7.

```

1  ctgagtggtg tatagagggt tgcctgggaa cgggcgttt atataaaac agtgagaggt
61  gaacATGCG TAATGTGTGATTGCCGTTG Ctgtcttgc cgcacttgc gtgacagtca
121 ctccggcccg tgcggaaggt ggacatgta cgtttacggt ggctatftt caagtgaac
181 cgggtacatt gccctcgttg tgggcccggg ataccgggtg gagtcaictg aaagggatta
241 acgtgaagta ccgttatgag ctgacggaca gtgtgggggt gatggctcc ctggggttcg
301 ccgctcgaa aaagagcagc acagtgatga cgggggagga tacgtttcac tatgagagcc
361 tgcgtggacg ttatgtgagc gtgatggccg gaccggttt acaaatcagt aagcaggta
421 gtgcgtacgc catggccgga gtgctcaca gtcgggtgtc cggcagtaca atggattacc
481 gtaagacgga aatcactccc gggtatatga aagagacgac cactgccagg gacgaaagtg
541 caatcgcgca tacctcagtg gcgtggagtg caggtataca gattaatccg gcagcgtccg
601 tcgttgta tattcttat gaaggctccg gcagtggcga ctggctact gacggattca
661 TCGTTGGGGT CGGTTATAAATTCtgattag ccagtaaca c

```

Figura 7. Secuencia nucleotídica del gen *lom* del fago λ . Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar este gen por PCR se muestran subrayados y con mayúsculas pequeñas. Secuencia tomada de Internet (Entrez Reports), NID g288849 (accession number X55793). (Barondess y Beckwith, 1990).

Para la reacción se utilizó Taq DNA polimerasa (Gibco BRL) y los oligonucleótidos fueron sintetizados por Accesolab (Gibco BRL); el ADN de λ^+ utilizado como control fue obtenido de Sigma Chemical Co. La secuencia de los oligonucleótidos, así como la concentración de $MgCl_2$ y las condiciones de amplificación utilizadas fueron las descritas por Vaca, 1999: 1 ciclo de 5' / 94° C, 25 ciclos de 30s a 94° C / 30s a 55° C / 1' a 72° C; y 1 ciclo de 7' a 72° C (Tabla 4). Sin embargo, hubo ciertas variaciones en la temperatura de alineamiento (hacia 50° C), como se muestra en los resultados. Se utilizaron 80-100 ng de DNA de los diferentes fagos como templado para la amplificación, y los productos se resolvieron y analizaron en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio (la electroforesis se realizó a 80 volts, durante 2 horas aproximadamente).

El volumen final de cada reacción fue de 50 μ l, y la mezcla de reacción contenía lo siguiente (Tabla 4):

Reactivo	Volumen (μ l)	Concentración final (para 50 μ l)
PCR buffer 10X	5	1X
MgCl ₂	1.5	1.5 mM
dNTP's 10 mM	1	2 mM
Oligo <i>lom1</i> (500 ng/ μ l)	1	500 ng
Oligo <i>lom2</i> (500 ng/ μ l)	1	500 ng
DNA molde (20 ng/ μ l)	4	80 ng
H ₂ O	36	
Taq DNA pol (3 U/ μ l)	0.5	1.5 U

Tabla 4. Condiciones de PCR para la amplificación del gen *lom*.

RESTRICCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

Para determinar si los productos de amplificación por PCR son secuencias relacionadas con *lom*, se realizó el análisis de restricción de algunos de estos productos con la endonucleasa Sma I (Boehringer Mannheim). Cada enzima de restricción requiere de condiciones óptimas para su funcionamiento; el búfer indicado por la compañía manufacturadora fue el Buffer A a concentración final 1X. Se incubó a 37° C durante 2 horas, el cóctel de reacción que contenía aproximadamente 200 ng de ADN, 1 unidad Sma I, a un volumen final de 15 μ l. La restricción se analizó por electroforesis en geles de agarosa 2% (80 volts, 2-3 horas), teñidos con bromuro de etidio.

RESULTADOS

1. LISOGENAS CONSTRUIDAS

Las bacterias lisógenas construidas de acuerdo a la metodología se muestran en la Tabla 5.

CEPA SENSIBLE	CEPA LISOGENICA
<i>Escherichia coli</i> C600	C600(λ)
<i>Escherichia coli</i> AB1157	AB1157(λ , <i>plac5cl₈₅₇</i>)
<i>Escherichia coli</i> W3110	- De fagos silvestres, por grupos de inmunidad: W1, WII, WIII, WIV, WV, WVI, WVII, WVIII, WIX, WX, WXI, WXII, WXIII, WIV, WV, WVI, WVII, WVIII, WXIX, WXX. - W3110(λ)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	PIZ15, PA01(D3)

Tabla 5. Lisógenas construidas.

2. ANALISIS DE GRUPOS DE INMUNIDAD

De los fagos estudiados en *P. aeruginosa* PA01, tanto FIZ15 como D3 fueron incapaces de multiplicarse en la lisógena del fago contrario (Tabla 6), corroborándose estos datos con los reportados en Vaca *et al*, 1999, posiblemente por una modificación al receptor fágico post-infección.

De la misma forma, en cada tapiz de las 20 lisógenas de *E. coli* W3110, se observó un halo de lisis correspondiente a cada fago distinto del fago de la lisógena, incapaz de multiplicarse sobre una cepa ya infectada por él mismo.

CEPA	FAGO	D3	FIZ15
PA01		+	+
PIZ15		-	-
PA01(D3)		-	-

Tabla 6. Inmunidad de los fagos FIZ15 y D3 en las lisógenas para PA01. + = aparición de halo de lisis, - = ausencia de halo de lisis

3) ADHESION BACTERIANA A CBH, a 30° C

IMPLICACION DE LA REGION *b* DE λ , EN EL INCREMENTO DE LA ADHESION DE SUS LISOGENAS.

Se ha reportado un incremento en la adhesión de *E. coli* a CBH mediado por λ a 37° C, utilizando las cepas C600 y AB1157 de *E. coli* K12; tal estudio constituye una fuerte evidencia de que el gen involucrado en dicho fenotipo es el gen fágico *lom*, ya que cuando se mutagenizó por inserción de un transposón, se abatió el fenotipo (Vaca *et al*, 1997). El gen *lom*, así como otros tres marcos de lectura abierta (ORFs) adyacentes, se encuentran localizados en la llamada región *b*, del genoma de λ . En el presente experimento se ha analizado el efecto de los profagos λ^+ y $\lambda_{lac5cI_{857}}$ sobre la adhesión de la cepa AB1157 a CBH; el fago $\lambda_{lac5cI_{857}}$ posee el operón *lac* de *E. coli* sustituyendo la región *b* del genoma de λ (213 pb del extremo derecho del gen *lom*, así como los 3 ORFs adyacentes a él), abarcando desde el nucleótido 19369 hasta el 23278. El cultivo bacteriano e incubación de muestras en estos ensayos fueron realizados a 30° centígrados, para evitar la lisis de las bacterias debido a que el alelo *cl₈₅₇* codifica para una proteína represora de la vía lítica termosensible, que se inactiva a temperaturas iguales o superiores a 37° C. Los lavados de

células, bacterias y mezcla de incubación se realizaron a temperatura ambiente ($\approx 23^{\circ}\text{C}$).

Como se aprecia en la Tabla 7, el profago λ incrementó la adhesión de la cepa AB1157 a CBH en un 50%, mientras que dicho incremento no se produjo por el profago $\lambda\text{plac5Cl}_{857}$. Los resultados son el promedio de al menos 3 ensayos independientes.

CEPA	BACTERIAS/CBH 30 °C	BACTERIAS/CBH 37° C *
Ninguna	2.4 ± 1.5	1.9 ± 0.1
AB1157	21.4 ± 3.2	18.8 ± 1.9
AB1157 (λ^+)	33.4 ± 4.0	30.9 ± 0.2
AB1157 ($\lambda\text{plac5Cl}_{857}$)	23.8 ± 3.7	-

Tabla 7. La región *b* de λ está implicada en el incremento en la adhesión de *E. coli* a CBH a 30° C. * Vaca *et al*, 1999.

4) ADHESION BACTERIANA A CBH, 18° C

A) ADHESION DE *E. coli* Y SUS LISOGENAS A CBH, A 18° C.

Dado que los pili de *E. coli* no se sintetizan y/o ensamblan a baja temperatura (Strom y Lory, 1993), se pensó en la posibilidad de evaluar si el mecanismo conferido por el profago posee patrones similares a los de los pili, en cuanto a la conformación de estructuras de membrana externa o síntesis. De esta forma, se pretendió disociar la adhesión de *E. coli* a CBH mediada por pili, de la conferida por la proteína *lom* del profago.

Por lo anterior, se cultivaron las bacterias a 18° C durante 24 horas, y se midió su adhesión a CBH a esta temperatura; los lavados se realizaron a

baja temperatura (4° C). Los resultados obtenidos, que se muestran en la Tabla 8, son el promedio de al menos tres ensayos independientes. Como se observa, en las condiciones del ensayo se permite valorar el incremento en la adhesión conferida por el profago λ , y que dicho mecanismo no es afectado por las bajas temperaturas (18° C).

CEPA	BACTERIAS / CBH 18° C	BACTERIAS/CBH 37° C *
Ninguna	1.8 ± 0.46	1.9 ± 0.1
AB1157	2.3 ± 0.80	18.8 ± 1.9
C600	2.8 ± 0.65	19.4 ± 1.5
AB1157(λ^+)	7.8 ± 0.32	30.9 ± 0.2
C600(λ^+)	9.9 ± 0.65	31.0 ± 0.3

Tabla 8. Adhesión de *E. coli* y sus lisógenas a CBH, a 18° C. * Vaca, 1999.

B) ADHESION DE *P. aeruginosa* Y SUS LISÓGENAS A CBH, A 18° C.

Con la finalidad de evaluar si los mecanismos de adhesión en *P. aeruginosa*, tales como pili, adhesinas y mucosa, son afectados por las bajas temperaturas, así como evaluar si el mecanismo conferido por los profagos FIZ15 y D3 tiene un comportamiento independiente a estos mecanismos bacterianos, y de manera general observar si el fenómeno presenta un comportamiento similar al de *E. coli*, se realizaron ensayos de adhesión a 18° C de *P. aeruginosa* y sus lisógenas para FIZ15 y D3. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9, de los que se infiere que los mecanismos de adhesión en *P. aeruginosa* no son afectados por las bajas temperaturas, ni los mecanismos conferidos por ambos profagos; debido a esto no se pudo disociar los mecanismos presentes. Los resultados son el promedio de al menos 3 ensayos independientes.

CEPA	BACTERIAS/CBH 18° C	BACTERIAS/CBH 37° C *
Ninguna	1.95 ± 1.36	1.8 ± 0.9
PA01	21.35 ± 3.22	21.5 ± 1.7
PIZ15	33.13 ± 4.78	35.6 ± 1.3
PA01(D3)	31.55 ± 4.34	28.9 ± 0.2

Tabla 9. Adhesión de *P. aeruginosa* y sus lisógenas a CBH, a 18° C. * Vaca, 1999.

5. EXTRACCION DE ADN FAGICO

De acuerdo a la metodología empleada, se purificó el ADN de cada uno de los 20 colifagos silvestres, así como de λ^* (utilizado como control para PCR) y los fagos D3 y FIZ15. La calidad y concentración del ADN fue analizada en geles de agarosa 0.8% teñidos con bromuro de etidio. Se corrieron 5 μ l de cada muestra, y como se muestra en la Figura 8, el ADN fágico fue extraído en buenas condiciones ya que no se observa degradación ni presencia de proteínas. Cabe mencionar que en las primeras preparaciones se encontró la presencia de ARN (Figura 8); este último fue reducido considerablemente en las siguientes extracciones, obteniendo mejores lisados de fagos y centrifugando por 15' a 5 krpm, previo a la aplicación de cloroformo para evitar la lisis de bacterias no infectadas o lisógenas (Figura 9). Sin embargo, se considera que la presencia de algún ARN contaminante es intrascendente para las reacciones de PCR, debido a que la polimerasa es dependiente de ADN. Para estimar la concentración de las muestras, se corrió en el gel una muestra de ADN de λ de concentración conocida, a partir del cual se dedujo aproximadamente la concentración de las demás muestras, de acuerdo a la intensidad de las bandas. Las muestras fueron diluidas para obtener una concentración aproximada de 20-25 ng/ μ l. También se encontró una ligera variación en el tamaño de los diferentes genomas, en comparación con el tamaño de λ (Figs. 8 y 9).

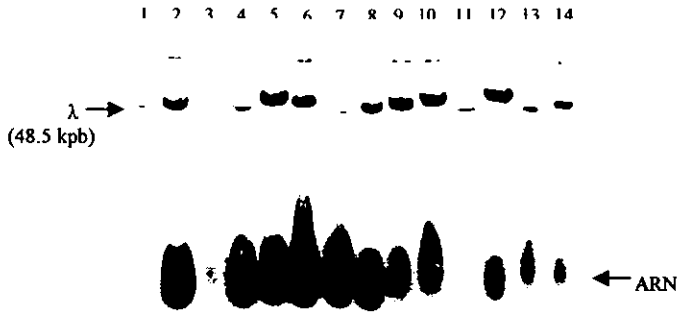


Figura 8. Electroforesis del ADN extraído de colifagos silvestres. Carriles: 1, λ (40 ng); 2, II; 3, IV; 4, VI; 5, VII; 6, VIII; 7, IX; 8, XII; 9, XIII; 10, XV; 11, XVII; 12, XVIIIb (mEp123); 13, IX; 14, XX (fagos según grupo de inmunidad; para nombres véase Tabla 3).

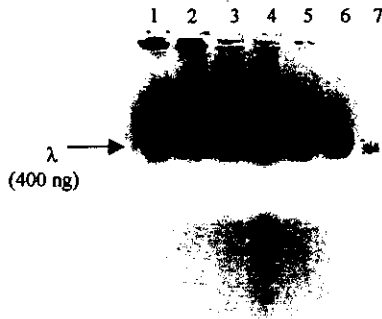


Figura 9. Electroforesis del ADN fágico (técnica estandarizada). Carriles: 1, λ (400 ng); 2, I; 3, III; 4, V; 5, X; 6, XVI; 7, XVIII. Fagos según grupo de inmunidad (Tabla 3).

6. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS AL GEN *lom*

Debido a que el gen *lom* de λ incrementa la adhesión de *E. coli* a CBH, y de esta forma confiere cierta ventaja selectiva tanto a la bacteria como al bacteriófago, posiblemente se encuentra diseminado en las poblaciones de colifagos silvestres y en otros bacteriófagos. Para determinar si estos fagos poseían una secuencia homóloga al gen *lom*, se utilizó su ADN como molde para una reacción de PCR, empleando como cebadores los oligonucleótidos complementarios a los extremos 5' y 3' del gen *lom* del fago λ (Fig. 7). Los productos obtenidos de la reacción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % (Figuras 10-13). Como control positivo se utilizó como molde el genoma de λ (Sigma Chemical Company), y como control negativo el plásmido pCJ11 (que no contiene secuencias relacionadas con *lom*). Inicialmente se encontró que de un total de 12 fagos probados, solamente en 2 se obtuvo un producto de amplificación, cuyas inmunidades son I y VII (Figura 10, carriles 3 y 9).

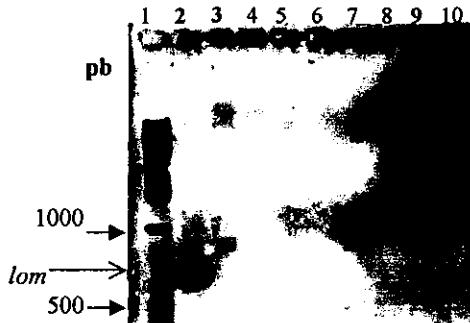


Figura 10. Amplificación del gen *lom* por PCR -I. Se sometieron a electroforesis 5 μ l de cada reacción en geles de agarosa al 1.5%. Carriles: 1, marcador de peso molecular (1kb DNA Ladder, Gibco BRL); 2, λ ; 3, I; 4, II; 5, III; 6, IV; 7, V; 8, VI; 9, VII; 10, VIII. Fagos según grupo de inmunidad (Tabla 3). Temperatura de alineamiento: 55° C.

Cabe mencionar que las reacciones se llevaron a cabo preparando un cóctel general de reacción que contenía todos los componentes, exceptuando el ADN molde, el cual fue añadido al final para cada tubo. En la reacción del fago de inmunidad VII se presentó una banda cuyo tamaño corresponde al de *lom* (Fig. 10, carril 9), mientras que para el fago de inmunidad I (no λ -lambdoide) se presentó una banda cuyo tamaño es superior al de *lom*, aproximadamente de 1000 pb (Fig. 10, carril 3).

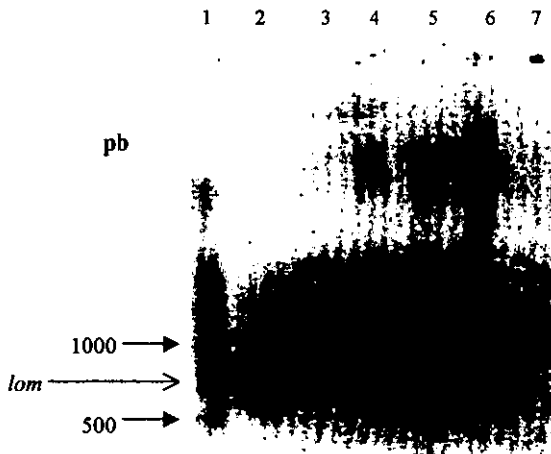


Figura 11. Amplificación del gen *lom* por PCR; temperatura de alineamiento: 50 °C. Carriles: 1, 1kb DNA Ladder (Gibco BRL); 2, λ ; 3, pCJ11; 4, I; 5, λ + I; 6, VII; 7, sin ADN molde.

Posteriormente se realizó una PCR reduciendo la temperatura de alineamiento hasta 50° C, esperando una mejor amplificación en los fagos de inmunidad I y VII; se utilizó como control positivo a λ y como negativo a pCJ11. Como se muestra en la Figura 11, la amplificación por el fago del grupo I se vió mejorada (carril 4), no así la del fago VII (carril 6). También se realizó, como prueba preliminar de la calidad de las preparaciones de ADN,

una reacción en la cual se utilizó como molde ADN de λ (Sigma Co.) a una concentración igual al control, y se añadió ADN del fago de grupo I (concentración igual a la reacción del carril 4), esperando ver el posible efecto inhibitorio de esta última preparación; se utilizó el doble de concentración de oligos, para evitar una reacción de competencia. Como se muestra en el carril 5, no hubo una reducción en la eficiencia de la reacción apreciable. Adicionalmente se hizo una reacción control negativo (carril 7), que consistió en lo siguiente: durante la extracción de ADN de fagos, al tapiz de *E. coli* W3110 sin fagos (utilizado como referencia para evaluar la lisis confluyente), le fue dado el mismo tratamiento que a las placas con fagos, obteniendo una solución sin ADN fágico que sirvió para evaluar si en las preparaciones había algún ADN cromosómico contaminante que pudiese dar una reacción de amplificación inespecífica (ya que podría existir una secuencia cromosómica homóloga a *lom*), tanto a temperatura de alineamiento de 50 °C (Figura 11, carril 7) como de 55° C (no mostrado). En ninguno de estos tratamientos se detectó amplificación alguna.

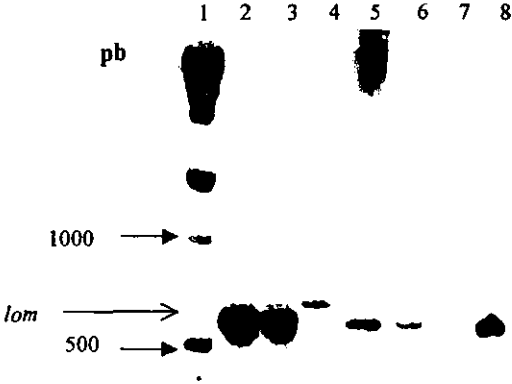


Figura 12. Amplificación del gen *lom* por PCR -II. Carriles: 1, 1kb DNA Ladder (Gibco BRL); 2, λ comercial; 3, λ laboratorio; 4, XIV; 5, XV; 6, XVI; 7, XVII; 8, XVIII (W-1).

Dado que no mejoró significativamente la eficiencia de reacción para los 2 fagos, y considerando la aparición de posibles bandas inespecíficas (Fig. 11, carriles 3 y 6), se decidió continuar con las PCR utilizando una temperatura de alineamiento de 55° C. Para estos experimentos se realizó una extracción de ADN de λ en el laboratorio, para evaluar de manera directa si las preparaciones de ADN elaboradas presentaban algún efecto inhibitor en la PCR. Como se muestra en la Figura 12, los ensayos utilizando ADN comercial y ADN preparado en laboratorio, no muestran diferencias apreciables en su eficiencia de reacción (carriles 2 y 3).

Los demás colifagos que presentaron una amplificación positiva fueron de las inmunidades XIV, XV, XVI, XVIII (W-1) (Figura 12, carriles 4, 5, 6 y 8), el fago silvestre de inmunidad XVIII (mEp 123) (Figura 13, carril 4), así como los fagos de *Pseudomonas aeruginosa* FIZ15 y D3 (Fig. 13, carriles 7 y 8), todos éstos en una PCR con temperatura de alineamiento de 55° C.

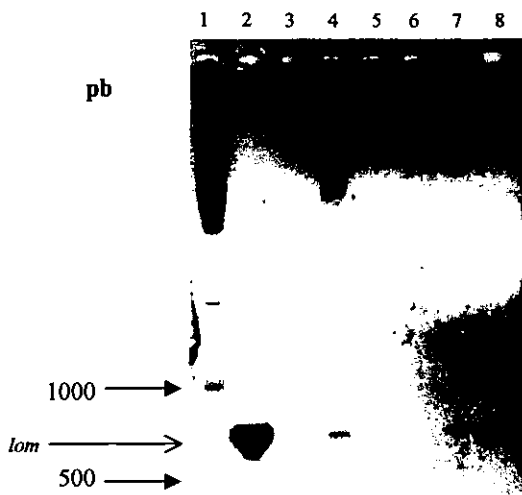


Figura 13. Amplificación del gen *lom* por PCR -III.
 Carriles: 1, 1kb DNA Ladder (Gibco BRL); 2, λ ; 3, XI; 4, XVIIIb (mEp 123); 5, XIX; 6, XX; 7, FIZ15; 8, D3.

7. RESTRICCIÓN DE SECUENCIAS AMPLIFICADAS

Un criterio para definir que los productos de amplificación obtenidos en los experimentos de PCR corresponden a secuencias relacionadas con *lom*, es el análisis de restricción. Por esto, se realizó la digestión de algunos productos de PCR con la endonucleasa *Sma* I; el gen *lom* posee 2 sitios de corte para esta enzima, liberando 2 bandas correspondientes a 200 y 500 pb.

Como se muestra en la Figura 14, los productos amplificados a partir del ADN de los fagos XV, FIZ15 y D3 muestran un patrón de restricción similar al de *lom* (carriles 2, 4, 5 y 6), liberando bandas de aproximadamente 200 y 500 pb. En contraste, el producto de amplificación a partir del fago no-lambdaide (inmunidad I), no mostro estos sitios de restricción (carril 3).

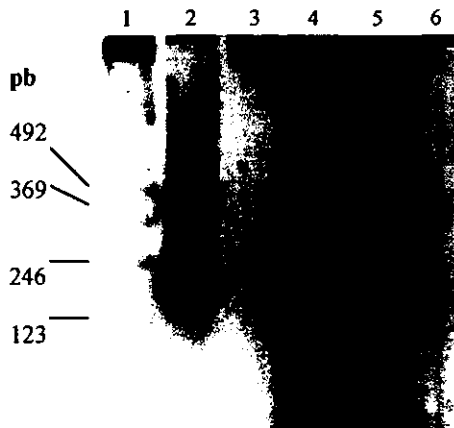


Figura 14. Restricción de productos de PCR con *Sma* I. Carriles: 1, 123 bp DNA Ladder (Sigma Chemical Co.); 2, λ *lom*; 3, I; 4, XV; 5, FIZ15; 6, D3.

DISCUSION

En este trabajo se ha demostrado que la región *b* de λ esta implicada en el incremento de la adhesión de *E. coli* (λ) a células bucoepiteliales humanas (CBH). Las bacterias lisógenas para el fago λ^+ mostraron un incremento de 50% en la adhesión, mientras que las lisógenas para el fago $\lambda_{lac5cb57}$ (que carece del gen *lom* y los tres ORFs adyacentes, por sustitución con *lac*) se adhirieron a niveles similares a los de la no lisógena (Tabla 7). Esto esta en acuerdo con lo reportado por Vaca, 1997; en dicho estudio se mutagenizó al gen *lom* por inserción del transposón *TnPhoA*, viéndose inhibido el efecto convertidor del fago en la adhesión bacteriana ya sea por la ausencia de la proteína *Lom* en la membrana externa, la cual puede participar directamente en la adhesión o regular la síntesis de otra(s) proteína(s), o por un efecto polar del transposón *TnPhoA* sobre la transcripción de los tres ORFs a la derecha de *lom*. En el presente trabajo se utilizó un fago que tiene sustituida la región *b* entera, encontrando efectos similares.

Por otro lado, se muestra que el mecanismo conferido por el profago λ a su lisógena no presenta patrones similares a los de los pili, en cuanto al ensamblaje de estructuras de membrana externa o síntesis. Dado que los pili de *E. coli* no se sintetizan y/o ensamblan a baja temperatura (Strom y Lory, 1993), se pudo disociar el de éstos del mecanismo conferido por el profago mediante un ensayo de adhesión a 18° C (Tabla 8). Como se observa, las condiciones del ensayo permitieron valorar el incremento en la adhesión conferida únicamente por el mecanismo del profago λ , y que dicho mecanismo no es afectado por las bajas temperaturas (18° C), a diferencia de los pili bacterianos.

Con la finalidad de evaluar si los mecanismos de adhesión en *P. aeruginosa*, tales como pili, adhesinas y mucosa, son afectados por las bajas

temperaturas, así como evaluar si el mecanismo conferido por los profagos FIZ15 y D3 tiene un comportamiento independiente a dichos mecanismos bacterianos, y de manera general observar si el fenómeno presenta un comportamiento similar al de *E. coli*, se realizaron ensayos de adhesión a 18° C de *P. aeruginosa* y sus lisógenas para FIZ15 y D3. Los resultados obtenidos muestran que los mecanismos de adhesión en *P. aeruginosa* no son afectados por las bajas temperaturas, ni los mecanismos conferidos por ambos profagos (Tabla 9); debido a esto, no se pudo disociar el efecto de los mecanismos bacteriano y fágico. Probablemente la principal vía de adhesión en *P. aeruginosa* consiste en la cubierta de polisacáridos que la rodean; en relación con esto, no se apreció visualmente pérdida de dicha secreción en los cultivos a baja temperatura.

Todas las alteraciones superficiales conferidas por λ , D3, FIZ15 u otros fagos a sus bacterias lisógenas, pueden jugar un papel muy importante en la selección natural de ambos en los hospederos animales. Debido a esta ventaja selectiva, el gen *lom* podría estar ampliamente distribuido entre los fagos temperados; cabe destacar que los fagos λ , lambdoides y D3 poseen organizaciones genómicas muy similares en sus respectivas regiones de inmunidad y de genes accesorios. Por todo esto, se analizó la distribución de secuencias relacionadas con *lom* en una serie de colifagos silvestres representativos de diferentes grupos de inmunidad, así como en un fago no lambdoide (inmunidad I), y en los fagos D3 y FIZ15 de *P.aeruginosa*. El ADN de estos fagos fue utilizado como molde para PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para *lom*. Se encontró una amplificación positiva en los colifagos silvestres de inmunidad I, VII, XIV, XV, XVI, XVIII (mEp 038, mEp 173, mEp 460, mEp 506, mEp 505 y mEp 123, respectivamente), así como en los fagos W-1 (variante genética de λ , inmunidad XVIII), D3 y FIZ15. Varias reacciones no mostraron un rendimiento similar al del control λ^+ , y se consideraron los siguientes aspectos para explicar la baja intensidad de estas reacciones

positivas (evidente en fagos de los grupos I, VII, XIV, XVI): que la temperatura de alineamiento fuese demasiado alta para la amplificación en estos moldes; otra posibilidad es que las preparaciones de ADN podrían contener algún elemento contaminante que resultara inhibitorio para las reacciones (p.e. sales, fenol); por último, que dichas secuencias amplificadas tuvieran solamente una similitud parcial con *lom* (por lo menos en la secuencia del oligonucleótido iniciador), de manera que las reacciones fueran positivas, aunque no tuvieran el rendimiento esperado.

Entonces se procedió a realizar PCR con una temperatura de alineamiento reducida a 50° C, y no se encontró una mejora evidente en la eficiencia de las reacciones (Figura 11), pero comenzaron a aparecer reacciones inespecíficas más marcadas; adicionalmente se probó de manera preliminar si las preparaciones de ADN elaboradas pudieran inhibir la PCR, añadiendo a una reacción control la preparación de ADN del colifago grupo I. No se encontró una reducción apreciable en la eficiencia de la reacción, lo que sugiere que las preparaciones de ADN de laboratorio no inhibían la PCR por algún contaminante.

Con el fin de corroborar directamente lo anterior, se realizó una preparación de ADN de λ , y los resultados muestran que los ensayos utilizando ADN comercial y ADN preparado en laboratorio, no presentan diferencias apreciables en su eficiencia de reacción: no hubo inespecificidad, y la concentración del producto es casi idéntica (Figura 12, carriles 2 y 3). Con esto se descarta que las preparaciones de laboratorio tuvieran contaminantes inhibidores para la PCR. Considerando esto, y que la reducción en la temperatura de alineamiento no condujo a un incremento notorio en la eficiencia de reacción (incluso el producto detectado en el fago de grupo VII a 55° C, desaparece ya que se incrementan las reacciones inespecíficas superiores a 20 kpb, Figura 12, carril 6), se prosiguió el estudio con una temperatura de alineamiento de 55° C. Por todo esto, es probable

que la baja intensidad de las reacciones positivas en los colifagos silvestres se deban a que existe una similitud parcial en la secuencia amplificada (por lo menos en las secuencias iniciadoras). Se detectaron en las reacciones de los fagos mEp 173, mEp 506 y mEp 123 (inmунidades VII, XV y XVIII) ciertas bandas inespecíficas, superiores a 20 kpb, que probablemente compiten por los oligonucleótidos iniciadores, reduciendo la eficiencia de la reacción; cabe destacar que dichas reacciones inespecíficas no fueron detectadas en los fagos con reacción negativa (Figuras 10-13).

El fago no lambdoide mEp 038 (grupo de inmunidad I) mostró una reacción positiva, con una banda superior al tamaño de *lom* (Figuras 10 y 11), lo que sugiere la posibilidad de que ciertos fagos presenten secuencias relacionadas con *lom*, con una similitud parcial. La diseminación de estas secuencias relacionadas con *lom* en algunos colifagos silvestres apoya la hipótesis de que el producto de este gen puede representar una ventaja selectiva para el profago y su bacteria lisógena, destacando el hecho de que además de presentarse en algunos colifagos lambdoides, parece presentarse en no-lambdoides y claramente en los fagos de *P. aeruginosa* FIZ15 y D3.

Dentro de este aspecto, se utilizó el criterio de análisis de restricción para definir si los productos de amplificación por PCR correspondían a secuencias homólogas, y se vió que por lo menos en los fagos de *P. aeruginosa* y en el colifago silvestre XV el patrón de restricción era similar al de λ *lom*. En cambio, dicho patrón no se observó para el producto de PCR del colifago silvestre de inmunidad I (Figura 14). Adicionalmente, hay que señalar que a pesar de encontrarse secuencias homólogas en otros fagos, se requiere de los ensayos fenotípicos para determinar si dichas secuencias son funcionales, o si a pesar de ser funcionales, requieren de otros genes para rendir el fenotipo característico.

Dado que los fagos FIZ15 y D3 de *P. aeruginosa* presentaron secuencias relacionadas con *lom*. v considerando que ambos causan conversión lisogénica e incremento en la adhesión de su lisógena a células bucoepiteliales humanas (Vaca, 1999), se podría sugerir que la base genética de esta conversión en éstos fagos es similar a la de λ y *E.coli*, y que posiblemente el gen responsable se relacione estructural o funcionalmente con *lom*. .

El posible origen y transferencia de este y otros genes accesorios en fagos, útiles para las bacterias, queda como una cuestión que implica consideraciones complejas a nivel evolutivo, aún más para poder explicar la presencia de secuencias relacionadas en organismos que no poseen similitud de secuencia, sino de organización genómica.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES

El presente trabajo muestra evidencia de que la región *b* de λ está implicada en el incremento de la adhesión de *E. coli* (λ) a células bucoepiteliales humanas; dicho mecanismo conferido por el profago es independiente del mecanismo bacteriano de adhesión vía pili, y no es afectado por las bajas temperaturas (18° C) durante el crecimiento y desarrollo bacteriano. En *Pseudomonas aeruginosa*, tanto el mecanismo bacteriano de adhesión como el mecanismo conferido por los fagos FIZ15 y D3 a sus lisógenas, no son afectados por el crecimiento de esta bacteria a bajas temperaturas (18° C). Dado que ambos fagos poseen secuencias relacionadas específicamente con *lom* de λ , y ambos confieren un incremento en la adhesión de su lisógena a CBH, se sugiere que las bases genéticas de esta conversión lisogénica son similares entre estos fagos y λ . En cuanto a la diseminación del gen *lom*, se encontraron secuencias relacionadas en 5 colifagos silvestres lambdoides, representativos de distintos grupos de inmunidad. Un colifago silvestre no-lambdoide amplificó un producto de mayor tamaño (1 kpb), que no mostró un patrón de restricción correspondiente a *lom*.

REFERENCIAS

- BARONDESS, J. & BECKWITH, J. (1990) A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage λ . *Nature* 346: 871-874.
- BARONDESS, J. & BECKWITH, J. (1995). *bor* gene of phage λ , involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *J. Bacteriol.* 177:1247-53.
- CAVENAGH, M. & MILLER, R. (1986). Specialized transduction of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by bacteriophage D3. *J. Bacteriol.* 165: 448-452.
- CHEETHAM, B.F. & KATZ, M. (1995). A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol. Microbiol.* 18: 201-208.
- COLEMAN DC, SULLIVAN DJ, RUSSELL RJ, ARBUTHNOTT JP, CAREY BF, POMEROY HM (1989) *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J Gen Microbiol Jun*;135 (Pt 6):1679-97
- DOIG, P.; SASTRY, P.; HODGES, R.; LEE, K.; PARANCHYCH, W. & IRVIN, R. (1990) Inhibition of pilus-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells by monoclonal antibodies directed against pili. *Infect. Immun.* 58: 124-130.
- FARINHA, M., ALLAN, B, E. GERTMAN, RONALD, D., KROPINSKI, A. (1994) Cloning of the early promoters of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3: Sequence of the immunity region of D3. *J.Bacteriol.* 176: 4809-4815.
- FARINHA, M. & KROPINSKY, A. (1997). Overexpression, purification, and analysis of de *cI* repressor protein of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3. *Can. J. Microbiol.* 43: 220-227.
- HAHN, H. (1997). The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*-- a review. *Gene*, 192:1, 99-108.

HEFFERNAN, E; HARWOOD, J; FIERER, J; GUINEY, D. (1992) The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid complement resistance gene *reck* is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including *pagC* and *ail*. *J. Bacteriol.* 174: 84-91.

HEFFERNAN, E; WU, I; LOUIE, J; OKAMOTO, S; FIERER, J & GUINEY, D. (1994). Specificity of the complement resistance and cell association phenotypes encoded by the outer membrane protein genes *reck* from *Salmonella typhimurium* and *ail* from *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 62: 5183-5186.

HOLLOWAY, B. & COOPER G. (1962) Lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 84: 1321-1324.

HUANG, A; FRIESEN, J; BRUNTON, J. (1987). Characterization of a bacteriophage that carries the genes for production of Shiga-Like toxin 1 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169 (9): 4308-12.

ISAACSON, R., NAGY, B., MOON, H. (1977) Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: colonization and adhesion factors of pig enteropathogens that lack K88. *J. Infectious Diseases.* 135 (4): 531-539.

ISAACSON, R. (1980) Factors affecting expression of the *Escherichia coli* pilus K99. *Infect. Immun.* 28(1): 190-194.

ISAACSON, R. (1983) Regulation of expression of *Escherichia coli* pilus K99. *Infect. Immun.* 40: 633-640.

KAMEYAMA, L; FERNANDEZ, L; CALDERON, J; ORTIZ-ROJAS, A; PATTERSON, T. (1999) Characterization of Wild Lambdoid Bacteriophages: Detection of a Wide Distribution of Phage Immunity Groups and Identification of a Nus-Dependent, Nonlambdoid Phage Group. *Virology* 263, 100-111.

KUZIO, J. & KROPINSKY, A. (1983). O-antigen conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 by bacteriophage D3. *J. Bacteriol.* 155: 203-212.

MILLER, R. & KOKJOHN, T. (1987) Cloning and characterization of the *cl* repressor of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3: a functional analog of phage lambda *cl* protein. *J. Bacteriol.* 169: 1847-1852.

MILLER, S; KUKRAL, A. & MEKALANOS, J. (1989) A two component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5054-5058.

MILLER, V; BLISKA, J. & FALKOW, S. (1990) Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica* *ail* gene and characterization of the Ail protein product. *J. Bacteriol.* 172: 1062-1069.

O'BRIEN, A; NEWLAND, J; MILLER, S; HOLMES, H; WILLIAMS, H.; FORMAL, S. (1984) Shiga like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 226: 694-6.

REEVE, J; SHAW, J. (1979) Lambda encodes an outer membrane protein: the *lom* gene. *Molec. Gen. Genet.* 172: 243-8.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E; MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Vol. 1, 2nd Edition. pp. 2.118-2.120. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SOORVOGEL, J; VAN BUSSEL, J; TOMMASSEN, J. & VAN DE KLUNDERT (1991) Molecular characterisation of an *Enterobacter cloacae* outer membrane protein (OmpX). *J. Bacteriol.* 173: 156-160.

SUNDSTROM, J., AGRUP, C., KRONVALL, G., WRETLIND, B. (1997). *Pseudomonas aeruginosa* adherence to external auditory canal epithelium. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery.* 123 (12): 1287-1292.

VACA, S.; ARGÜELLO, F.; ARENAS, D.; MORENO, R.; MARTINEZ, G. (1989). Potassium ions stimulate the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 31: 30-309.

VACA, S., PEREZ, S., MARTINEZ, G., ENRIQUEZ, F. (1993) Partial genetic characterization of FIZ15 bacteriophage of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 35: 251-257.

VACA, S.; GARCIA, O.; PANIAGUA, G.L. (1997) The *lom* gene of bacteriophage λ is involved in *Escherichia coli* K12 adhesion to human buccal epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters* 156:129-132.

VACA, S; PANIAGUA, G; GARCIA, O; DE LA GARZA, M. (1999) The clinically Isolated FIZ15 bacteriophage causes lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Current Microbiol.* 38: 239-243

VACA, S. (1999) Incremento de la adhesión y de la resistencia al suero humano en *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, mediado por los fagos λ y FIZ15. Tesis de Doctorado, FES Cuautitlán, UNAM.

WALDOR, M; MEKALANOS, J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding Cholera Toxin. *Science*, 272: 1910-14.